

ENTWICKLUNG VON MIKROPARTIKELN FÜR PARENTERALE  
DEPOTARZNEIFORMEN MIT BIOLOGISCHEN WIRKSTOFFEN

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

**Bonn**

vorgelegt von

**Julia Buske**

aus Ratzeburg

Bonn 2012



Angefertigt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. A. Lamprecht

Zweitgutachter: Herr Priv. Doz. Dr. K. G. Wagner

Tag der Promotion: 07. 01. 2013

Erscheinungsjahr: 2013



INHALTSVERZEICHNIS:

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Depotarzneiformen .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Hochkonzentrierte Flüssigformulierung (HCLF) .....	3
2.1.2 Suspension .....	4
2.1.3 In-situ Depot .....	4
2.1.4 Implantat .....	5
2.1.5 Partikuläres System.....	5
2.1.6 Übersicht .....	6
<b>2.2 Mikropartikel.....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Koazervation .....	8
2.2.2 Emulsionsverfahren .....	8
2.2.3 Sprühtrocknung.....	12
2.2.4 Überkritisches Gas .....	13
<b>2.3 Polymere .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Modellproteine .....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Lysozym.....	19
2.4.2 Bovines Serumalbumin (BSA) .....	20
2.4.3 Monoklonaler Antikörper (IgG) .....	21
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Herstellung von Mikropartikeln .....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Proteinlösung (wässrige Phase) .....	23
3.1.2 Polymerlösung (organische Phase) .....	23
3.1.3 Äußere Phase .....	24

3.1.4	Herstellung der Primäremulsion.....	24
3.1.5	Herstellung von Mikropartikeln im Labormaßstab .....	25
3.1.6	Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab .....	25
3.1.7	Gewinnung von Mikropartikeln .....	26
3.1.7.1	Filtration.....	26
3.1.7.2	Zentrifugation .....	26
3.1.8	Trocknung von Mikropartikeln .....	26
<b>3.2</b>	<b>Partikelcharakterisierung .....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Rasterelektronenmikroskopie .....	27
3.2.2	Partikelgrößenverteilung .....	28
3.2.3	Verkapselungsrate .....	29
3.2.4	In-vitro Freisetzung .....	30
3.2.4.1	In-vitro Freisetzung im Glasvial .....	30
3.2.4.2	Freisetzung mittels Freisetzungssapparatur .....	31
<b>3.3</b>	<b>Ergänzende Analysenmethoden.....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Konfokalmikroskopie .....	33
3.3.2	Spezifische Oberfläche .....	33
3.3.3	Restwassergehalt nach Karl Fischer.....	34
3.3.4	Proteinintegrität .....	34
3.3.5	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC).....	35
3.3.6	Lysozymaktivität .....	35
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Polymerscreening .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Optimierung des Herstellungsprozesses .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>Änderung des Stabilisators der äußeren Phase.....</b>	<b>57</b>

4.3.1	Identifizierung eines Stabilisators für die äußere Phase .....	57
4.3.2	Statistische Versuchsplanung .....	61
4.3.3	Etablierung von Methylcellulose als äußere Phase .....	66
<b>4.4</b>	<b>Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab.....</b>	<b>75</b>
4.4.1	Prozessentwicklung .....	76
4.4.2	Reproduzierbarkeit.....	79
4.4.3	Vergleich von Labormaßstab mit technischem Maßstab .....	81
<b>4.5</b>	<b>Lagerstabilität.....</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>103</b>
6.1	Geräte .....	103
6.2	Substanzen.....	107
6.3	Puffer .....	111
6.4	Materialien .....	113
6.5	Weitere Tabellen und Abbildungen.....	116
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>





## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BCA	Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid)
BSA	Bovines Serumalbumin
CLSM	Konfokale Laserrastermikroskopie (engl. confocal laser scanning microscopy)
CMC-Na	Natrium-Carboxymethylcellulose
d	Tag (engl. day)
D <sub>10</sub>	Partikelgröße, die 10% des gesamten Kollektivs aufweisen
D <sub>50</sub>	Partikelgröße, die 50% des gesamten Kollektivs aufweisen
D <sub>90</sub>	Partikelgröße, die 90% des gesamten Kollektivs aufweisen
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (engl. differential scanning calorimetry)
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (engl. Food and Drug Administration)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	Flügelrührer
G	Gauge (Maßeinheit für die Größe von Kanülen)
ggf.	gegebenenfalls
G-Wasser	Gereinigtes Wasser
HCLF	Hochkonzentrierte flüssige (Protein-)Formulierung (engl. High concentration liquid formulation)
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IEP	Isoelektrischer Punkt
Ig	Immunglobulin
IVIVC	In-vitro/in-vivo Korrelation (engl. In-vitro/in-vivo correlation)
kDa	Kilo-Dalton
LM	Labormaßstab
Lsg.	Lösung

MC	Methylcellulose
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MR	Magnetrührer
Na	Natrium
PEG	Polyethylenglykol
PLA	Polymilchsäure (engl. Polylactic acid)
PLGA	Poly lactid-co-Glycolid (engl. Poly(lactide-co-glycolide) acid)
PP	Polypropylen
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskop
rF	relative Luftfeuchtigkeit
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan (lat. sub cutis)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T <sub>g</sub>	Glasübergangstemperatur
TM	Technischer Maßstab
Triton-X	Octoxinol 9 (INN), nicht-ionisches Tensid
U/min	Umdrehungen pro Minute
USP	US-amerikanisches Arzneibuch (engl. United States Pharmacopeia)
VMD	Volumenbezogener, mittlerer Durchmesser (engl. volume mean diameter)
v.l.n.r.	von links nach rechts
v.o.n.u.	von oben nach unten
WFI	Wasser für Injektionszwecke

# 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Biopharmazeutika sind Arzneimittel, deren Wirkstoffe nicht auf chemischem Weg, sondern aus Mikroorganismen gewonnen werden. Gentechnisch veränderte Zellen produzieren Peptide oder Proteine, die zur Therapie von Krankheiten eingesetzt werden. In Deutschland beträgt der Anteil an Biopharmazeutika derzeit 19% vom gesamten Pharmamarkt. Die Biopharmazeutika, die sich momentan in der Entwicklung befinden, verhelfen bei immer mehr, auch seltenen Krankheiten zu neuen Behandlungsmöglichkeiten und sind ein fester Bestandteil der medizinischen Versorgung geworden [Heinemann et al., 2012].

Therapeutisch anwendbare Proteine müssen parenteral verabreicht werden. Eine perorale Applikation ist nicht möglich, da Proteine sowohl gastral als auch intestinal degradiert werden. Die Applikation unter Umgehung des Verdauungstrakts bietet mehrere Möglichkeiten. Die kontinuierliche Infusion wird häufig bei Zytostatika angewendet. Außerdem sind die intramuskuläre (i.m.) und die subkutane (s.c.) Applikation gebräuchlich. Gängige Arzneiformen sind Lösungen oder gefriergetrocknete Zubereitungen, die vor der Applikation rekonstituiert werden. Durch die zum Teil sehr kurze Halbwertszeit der biologischen Wirkstoffe von wenigen Minuten, ist eine wiederholte Injektion des Biopharmazeutikums erforderlich [Banga, 2006]. Gerade bei chronisch Erkrankten führt die wiederholte Injektion an den gleichen Applikationsort zu Verletzungen und Veränderungen des Gewebes (Lipodystrophie) und damit zu geringer Akzeptanz (Compliance). Die Entwicklung von Systemen, die parenteral appliziert werden und den Wirkstoff kontinuierlich über einen längeren Zeitraum wie Wochen oder Monate freisetzen, ist eine Alternative, die von Patienten und Medizinern gleichermaßen sehr geschätzt wird [Akers et al., 2007].

Um eine lang anhaltende Freisetzung eines therapeutisch wirksamen Proteins zu erzielen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine der gebräuchlichsten ist die Einbettung des Wirkstoffs in eine bioabbaubare Polymermatrix, zum Beispiel in Form von Mikropartikeln. Durch die Applikation des Systems in den Körper

wird das Protein durch eine Kombination aus Diffusion durch die Matrix und durch Degradation des Polymers freigesetzt. Es sind eine Reihe von bioabbaubaren Polymeren auf dem Markt zugelassen, die sich für die Mikroverkapselung eignen [Nair et al., 2007]. Häufig werden Polymere eingesetzt, die aus Milchsäure und Glykolsäure aufgebaut sind und als Polylactid-co-Glycolid (PLGA) beispielsweise unter dem Namen Resomer® erhältlich ist. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Evaluierung verschiedener Varianten des Resomer® Portfolios hinsichtlich der Herstellung von Mikropartikeln, der Partikeleigenschaften und der Protein-Freisetzung.

Die Herstellung von Mikropartikeln als Depotformulierung kann auf verschiedene Arten erfolgen, wobei jeder Prozess sehr komplex ist. Die Auswahl der geeigneten Methode hängt von verschiedenen Faktoren wie Herstellkosten, apparativem Aufwand und Skalierbarkeit ab. Ziel dieser Arbeit war es, einen Herstellungsprozess für Mikropartikel im Labormaßstab zu etablieren und die Skalierbarkeit in den technischen Maßstab zu gewährleisten.

Die Bandbreite therapeutisch wirksamer Proteine erstreckt sich über alle Proteinklassen hinweg. So werden die entzündlichen Prozesse der Multiplen Sklerose u.a. mit Zytokinen wie Beta-Interferon behandelt und Immunglobuline werden zum großen Teil in der Onkologie eingesetzt. Die Technologie zur Herstellung einer Depotformulierung sollte daher auf alle Typen der Proteinfamilie anwendbar sein und die kontrollierte Freisetzung von Proteinen im Molekülgrößenbereich von 10 bis 150 kDa ermöglichen. Eine Stabilität des Proteins während der Lagerung und während der Freisetzung sollte sichergestellt sein.

## **2 Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Depotarzneiformen**

Eine Depotarzneiform ist eine parenteral applizierte Darreichungsform, die im Muskel oder im Hautgewebe lokalisiert ist und den Wirkstoff kontinuierlich über einen längeren Zeitraum freisetzt. Davon abzugrenzen ist die Retardarzneiform, die den Wirkstoff ebenfalls über einen längeren Zeitraum freisetzt, jedoch peroral verabreicht wird. Ziel beider Darreichungsformen ist die verlängerte therapeutische Wirkung der aktiven Substanz bei verringerter Einnahme- bzw. Applikationsfrequenz [Bauer et al., 2006]. Im Gegensatz zu schnell freisetzenden Arzneiformen können im Körper durch die Depotwirkung gleichmäßig konstante Plasmaspiegel erzeugt werden und zu einer Verringerung von Nebenwirkungen führen.

Depotarzneiformen für therapeutisch anwendbare Proteine unterteilen sich im Wesentlichen in fünf Gruppen: hochkonzentrierte, flüssige (Protein-)formulierungen (HCLF) sowie Suspensionen, in-situ bildende Depots, Implantate und partikuläre Systeme.

#### **2.1.1 Hochkonzentrierte Flüssigformulierung (HCLF)**

HCLFs sind flüssige Proteinformulierungen mit einer Konzentration von mindestens 50 mg/mL. Sie werden durch Aufkonzentrierung der Proteinlösung mittels Ultrafiltration hergestellt. Die Zubereitung wird im Idealfall vom Patienten selbst subkutan appliziert. Durch den verlangsamten Abtransport des Wirkstoffs aus dem Gewebe tritt eine Depotwirkung ein. Im Vergleich zu niedrig-dosierten Proteinlösungen ist die Injektionsfrequenz beispielsweise von täglich auf alle zwei Tage reduzierbar. Bei monoklonalen Antikörpern, die zum Teil eine Halbwertszeit von mehreren Tagen oder Wochen haben, kann die Applikation 14-tägig oder monatlich erfolgen. Bei dieser Arzneiform ist die Depotwirkung allein von der Halbwertszeit des Proteins abhängig und nicht durch andere Vehikel steuerbar. Während des Herstell- und Abfüllprozesses werden die zum Teil hoch

viskosen Lösungen hohem Scherstress ausgesetzt, was zu einer Schädigung des Wirkstoffs führen kann und die Stabilität des Produkts beeinflusst [Warne, 2011].

### **2.1.2 Suspension**

Reine Proteinkristalle werden in einem Dispersionsmedium suspendiert und subkutan appliziert. Diese Depotform ist aktuell nur mit dem biologischen Wirkstoff Insulin auf dem Markt. Durch die Bindung des basischen Proteins Protamin an die Insulinmoleküle wird die Depotwirkung erzielt. Nach Applikation der Suspension aggregiert das Insulin aufgrund der pH-Wert-Änderung zu Hexameren, die sich in der Gewebsflüssigkeit langsam zu Monomeren auflösen. Nachteilig ist, dass die Freisetzung des Insulins ungleichmäßig erfolgt und der Plasmaspiegel anfangs höher ist als nach zwölf Stunden. An der Kristallisation weiterer Proteine wird geforscht, jedoch ist bisher keine weitere Formulierung auf dem Markt [Basu et al., 2004]. Bei der Entwicklung dieser Arzneiform spielt die Kristallgröße eine Rolle. Die Partikel sollten möglichst klein sein, um eine problemlose Applikation zu ermöglichen. Ferner sollten die Kristalle nicht aggregieren oder zerbrechen. Die Stabilität und Resuspendierbarkeit stellen ebenfalls eine große Herausforderung für die Entwickler einer solchen Arzneiform dar.

### **2.1.3 In-situ Depot**

Durch die intramuskuläre oder subkutane Injektion eines Flüssigkeitsgemisches bestehend aus dem Wirkstoff und dem Polymer bildet sich im Körper ein in-situ Depot. Ein bioabbaubares Polymer wird in einem biokompatiblen Lösungsmittel wie N-Methylpyrrolidon gelöst. Der Wirkstoff liegt als Pulver vor oder ist in einem wässrigen, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel wie Propylenglykol gelöst. Direkt vor der Applikation werden beide Komponenten miteinander gemischt. Das Lösungsmittel verteilt sich im Körper und mischt sich mit Gewebsflüssigkeit, so dass es zum Ausfallen des Polymers kommt. Es bildet sich ein Depot aus, das den eingeschlossenen Wirkstoff kontinuierlich freisetzt [Astellas, 2011; Packhaeuser et al., 2004]. Nach Anleitung eines Mediziners ist es möglich,

dass der Patient sich das Depot selbst appliziert. Die Injektion kann mit gebräuchlichen Kanülen erfolgen und ermöglicht eine nahezu schmerzfreie Verabreichung der Depotformulierung [Rungseevijitprapa et al., 2009]. Nachteilig bei dieser Arzneiform ist die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, die nach Applikation im Körper zu Unverträglichkeitsreaktionen führen können.

#### **2.1.4 Implantat**

Implantate haben eine zylindrische Form und sind ein bis vier Millimeter lang. Der Durchmesser liegt in der Regel bei einem Millimeter. Die Herstellung erfolgt über Heißpressen oder Schmelz-Extrusion. Dabei ist das Protein hohem physikalischem Stress (Temperatur, Druck, Scherung) ausgesetzt, was zu irreversibler Aggregation oder Modifikation des Proteins führen kann [Rothen-Weinhold et al., 2000]. Das Implantat wird meistens in einer Fertigspritze abgegeben, so dass die subkutane Applikation durch medizinisches Personal ohne großen Aufwand durchgeführt wird. In den meisten Fällen ist eine lokale Betäubung des Injektionsortes vorgesehen, weil die Verabreichung für den Patienten sonst schmerzhaft ist. Besteht das Implantat aus einem biologisch nicht abbaubaren Polymer wie Poly(ethylen-co-vinylacetat), so muss es nach der Wirkstofffreigabe chirurgisch aus dem Körper des Patienten entfernt werden.

#### **2.1.5 Partikuläres System**

Das partikuläre System setzt sich aus einem Mikropartikel-Pulver und einem Lösungs- oder Dispergiermittel zusammen. Vor der Applikation wird aus beiden Komponenten eine Suspension hergestellt, die subkutan appliziert wird. Das wässrige Lösungsmittel wird aus dem Gewebe rasch abtransportiert, die Mikropartikel verbleiben aufgrund ihrer Größe im subkutanen Raum und bilden das Depot. Mikropartikel bestehen zum größten Teil aus einem bioabbaubaren Polymer. Je nach verwendetem Polymertyp wird der Wirkstoff durch Diffusion und/ oder durch den Abbau des Polymers kontinuierlich aus dem System freigesetzt.

### 2.1.6 Übersicht

In Tab. 2.1 sind die verschiedenen Depotarzneiformen für Proteine zusammengefasst und durch Produktbeispiele ergänzt.

Tab. 2.1: Übersicht der Depotarzneiformen für therapeutisch anwendbare Proteine

Depot-arzneiform	Vorteil	Nachteil	Beispiel	
			Handelsname <i>Wirkstoff</i>	Intervall
<b>HCLF</b>	Herstellung mit vorhandenem Equipment	Aggregation	Xolair® <i>Omalizumab</i>	2 oder 4 Wochen
<b>Suspension</b>	Einfache Anwendung (z.B. Pen)	Instabilität (ungleichmäßige Freisetzung)	Huminsulin® <i>Insulin human</i>	täglich
<b>In-situ Depot</b>	Schmerzfreie Injektion	Unverträglichkeits- reaktionen mit org. Lösungsmittel	Eligard® <i>Leuprorelin</i>	1 – 6 Monate
<b>Implantat</b>	Hohe Wirkstoff- beladung	Applikation durch Arzt	Zoladex® <i>Goserelin</i>	1 – 3 Monate
<b>Partikuläres System</b>	Gute Dosierbarkeit	Bei Nebenwir- kungen schwer zu entfernen	Decapeptyl® Gyn <i>Triptorelin</i>	4 Wochen



## 2.2 Mikropartikel

Mikropartikel haben eine sphärische Form. Ihre Größe erstreckt sich über den gesamten Mikrometer-Bereich von 1 bis 1000  $\mu\text{m}$ . Die Partikelgröße ist durch den Herstellprozess steuerbar. Um eine Mikropartikel-Suspension subkutan zu verabreichen, sollten die Partikel nicht größer sein als der Innendurchmesser der verwendeten Kanüle. In der Regel werden 25 G bis 27 G Kanülen für die subkutane Applikation eingesetzt. Eine 27 G Kanüle hat durchschnittlich einen Innendurchmesser von 200  $\mu\text{m}$  [Reiche, 2010]. Das Pulver hat keine einheitliche Partikelgröße. Es handelt sich um ein Partikelkollektiv mit einer Partikelgrößenverteilung. Das heißt, dass die größten Partikel im Pulver kleiner sein sollten als 200  $\mu\text{m}$ , um eine schmerzfreie, subkutane Applikation zu ermöglichen.

Mikropartikel bestehen zum größten Teil aus einem bioabbaubaren Polymer, in das der Wirkstoff eingebettet wird. Die gängigen Verfahren für die Herstellung von Mikropartikeln auf Basis von Polyestern sind in Tab. 2.2 aufgelistet und werden folgend näher erläutert. Die Skalierbarkeit aller Verfahren ist möglich, ist aber zum Teil mit erhöhtem apparativem Aufwand verbunden.

Tab. 2.2: Standardverfahren zur Herstellung von Mikropartikeln

Technik	Vorteil	Nachteil
<b>Koazervation</b>	Geringer apparativer Aufwand	Große Lösungsmittelmengen
<b>Emulsionsverfahren</b>	Geringer apparativer Aufwand	Mehrstufiger Prozess mit vielen Variablen
<b>Sprühtrocknung</b>	Schnelles Verfahren	Hohe Anschaffungs- und Betriebskosten
<b>Überkritisches Gas</b>	Keine organischen Lösungsmittel	Hoher apparativer Aufwand

### 2.2.1 Koazervation

Mikropartikel können durch Phasentrennung – Koazervation – gewonnen werden. Es handelt sich dabei um einen mehrstufigen Prozess, der mit geringem apparativem Aufwand durchführbar ist. Das Polymer wird in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Dichlormethan) und der proteinogene Wirkstoff in seinem bevorzugten Puffersystem gelöst. Beide Phasen werden miteinander gemischt und homogenisiert, so dass eine W/O-Emulsion entsteht. Es ist auch möglich, das therapeutische Protein im lyophilisierten Zustand als Pulver in der organischen Phase zu dispergieren. Unter Rühren wird langsam ein Lösungsmittel (non-solvent) wie Silikonöl hinzugegeben, das weder das Polymer noch den Wirkstoff löst. Durch Desolvatation kommt es zu einer Auftrennung in eine polymerreiche Koazervatphase und eine polymerarme, kontinuierliche Phase. Es bilden sich Koazervattröpfchen aus, die den Wirkstoff einschließen. Das System wird in eine weitere Phase überführt, die aus einem organischen Lösungsmittel besteht, welches nur mischbar mit dem Polymer-Lösungsmittel und dem Nicht-Lösungsmittel ist (z.B. Heptan). Die Koazervattröpfchen härten zu Mikropartikeln aus, indem das restliche Lösungsmittel extrahiert wird. Die fertigen Partikel werden über Filtration oder Zentrifugation gewonnen, gewaschen, um Lösungsmittel-Rückstände zu entfernen und anschließend getrocknet. Während des Herstellprozesses kann es zu Koaleszenz der Tropfen und zu Agglomeration der Partikel kommen, bevor die Aushärtung vollständig stattgefunden hat. Durch Änderung von Prozessparametern wie Rührgeschwindigkeit oder Temperatur oder durch den Zusatz von Stabilisatoren kann dem entgegengewirkt werden [Wu, 1995]. Unvorteilhaft an diesem Verfahren ist der hohe Verbrauch an organischen Lösungsmitteln. Aus Gründen der Arbeitssicherheit und der Umweltverträglichkeit lässt sich dieser Prozess nicht ohne Aufwand in den großtechnischen Maßstab transferieren.

### 2.2.2 Emulsionsverfahren

Die am häufigsten verwendete Methode zur Herstellung von Mikropartikeln ist das Emulsionsverfahren. Man unterscheidet die einfache Emulsion von der Dop-

pelemulsion. Die Partikelaushärtung kann erneut in zwei Techniken unterteilt werden: Lösungsmittelverdampfung und Lösungsmittlextraktion (Abb. 2.1).

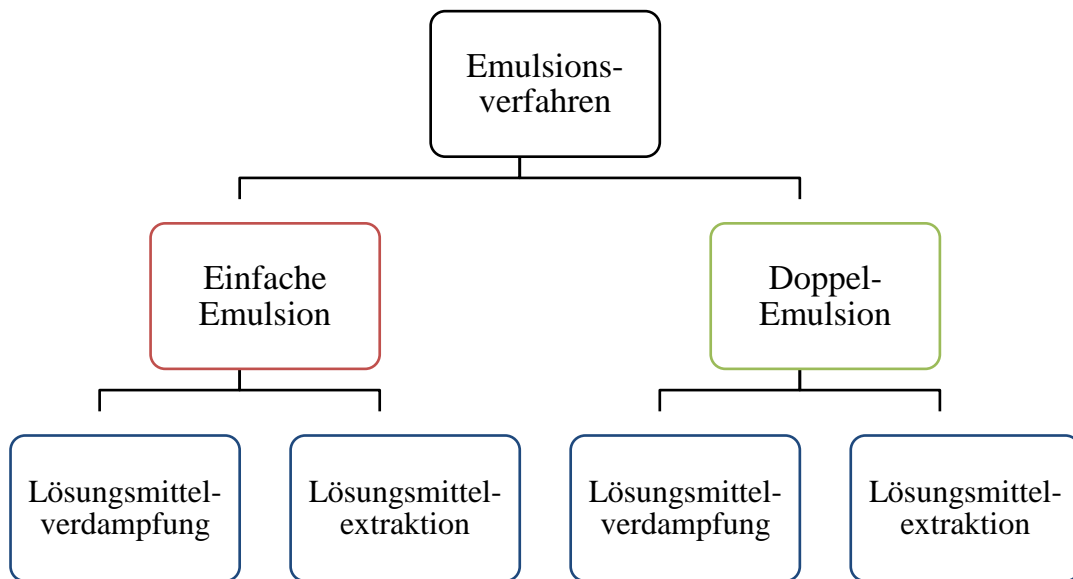


Abb. 2.1: Gliederung der Emulsionsverfahren

Allen Methoden liegt die Herstellung einer hydrophoben Phase zugrunde. Das bevorzugt bioabbaubare Polymer wird in einem organischen, mit Wasser nur begrenzt mischbaren Lösungsmittel gelöst.

Für das einfache Emulsionsverfahren wird der Wirkstoff in der organischen Phase gelöst oder dispergiert und in eine wässrige, äußere Phase gegeben, die einen Stabilisator enthält. Durch Einsatz von Rühr- oder Dispergiergeräten werden beide Phasen miteinander gemischt (Abb. 2.2).

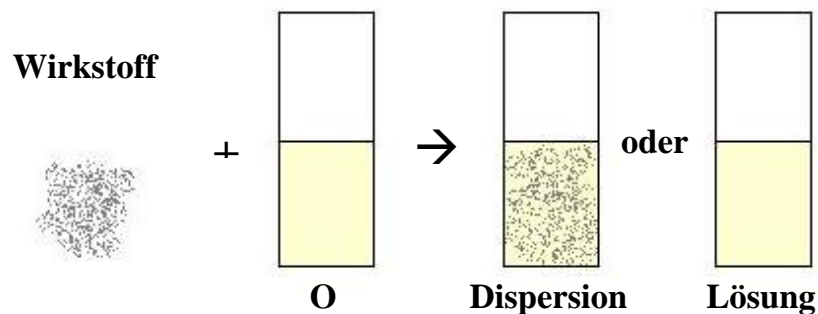


Abb. 2.2: Einfaches Emulsionsfahren

Im Doppelemulsionsverfahren wird eine wässrige Wirkstofflösung in der organischen Phase homogenisiert, so dass eine W/O-Emulsion entsteht (Abb. 2.3). Diese Primäremulsion wird ebenfalls in einer wässrigen, stabilisatorhaltigen Phase dispergiert. Dieses Gemisch bezeichnet man auch als Doppelemulsion  $W_1/O/W_2$ .

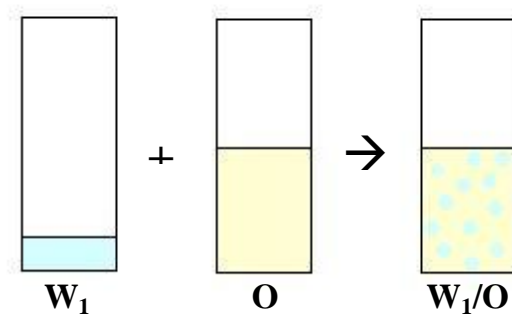


Abb. 2.3: Herstellung der Primäremulsion (Doppelemulsionsverfahren)

Dadurch, dass sich das Lösungsmittel nur zu einem geringen Teil in der äußeren, wässrigen Phase mischt, bilden sich kleine Tröpfchen aus, die aus Polymer und Wirkstoff bestehen (Abb. 2.4). Als Stabilisatoren in der äußeren Phase werden Substanzen eingesetzt, die amphiphile Eigenschaften haben und die Tröpfchen vor Koaleszenz schützen. Sehr gebräuchlich ist der Einsatz von Polyvinylalkohol.

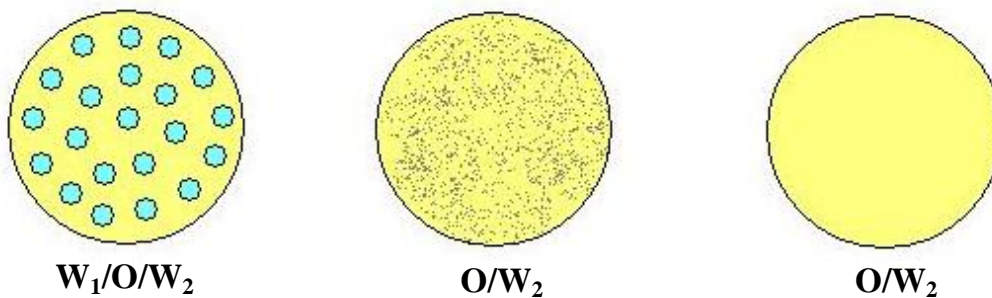


Abb. 2.4: Native Mikropartikel in äußerer Phase

Die Tröpfchen härten aus, indem das Lösungsmittel nach und nach in die wässrige Phase diffundiert (Lösungsmittlextraktion). Wenn das Lösungsmittel zusätzlich an der Oberfläche der wässrigen Phase verdampft, spricht man von Lö-

sungsmittelverdampfung. Die Mikropartikel werden über Filtration oder Zentrifugation von der äußeren Phase getrennt, gewaschen und getrocknet.

Viele Parameter beeinflussen den mehrstufigen Prozess. Zum Beispiel muss das Volumen der inneren, wässrigen Phase um ein Vielfaches kleiner sein als das Volumen der Polymerphase, um kompakte, nicht poröse Partikel zu erzielen [Chen et al., 2001]. Die Viskositäten der einzelnen Phasen sowie die Rührgeschwindigkeit und die Konzentration der äußeren Phase sind zu evaluieren, um optimale Mikropartikel herzustellen [O'Donnell et al., 1997]. Die Lösungsmittelverdampfung kann durch Temperaturänderung oder durch Anlegen von Vakuum beschleunigt werden, da die Verdampfung unter Normalbedingungen je nach Lösungsmittelvolumen Stunden dauern kann. Durch Änderung der Verdampfungs-kinetik können die Partikeleigenschaften verändert werden. Durch sehr schnelle Verdampfung entstanden poröse Partikel, indem Lösungsmitteltröpfchen in den embryonalen Partikeln explodierten [Arshady, 1991]. Durch die Evaporation unter reduziertem Druck entstanden hingegen Partikel mit kompakter Morphologie und verlangsamer Freisetzung von Progesteron [Izumikawa et al., 1991].

Bei der Lösungsmittlextraktion muss sichergestellt sein, dass das gesamte Lösungsmittel von der wässrigen Phase aufgenommen werden kann. In vielen Fällen wird die Primäremulsion bzw. die organische Dispersion oder Lösung erst einmal in einem kleinen Volumen der äußeren Phase dispergiert, um die Tröpfchen zu formen. Nach kurzer Zeit wird ein größeres Volumen einer wässrigen Phase hinzugegeben, das ausreichend ist, um das übrige Lösungsmittel zu extrahieren. Eine andere Möglichkeit ist, der äußeren Phase ein Co-Lösungsmittel beizumischen, welches mit Wasser und dem Lösungsmittel mischbar ist (z.B. Alkohole) und die Extraktion erleichtert [Tamber et al., 2005].

Das Verfahren der einfachen Emulsion eignet sich besonders für hydrophobe Wirkstoffe, die sich in der organischen Phase lösen. Hydrophile Wirkstoffe neigen dazu, während der Herstellung aus der organischen in die wässrige Phase zu diffundieren, resultierend in einer schlechten Verkapselungsrate. Daher ist für hydrophile Wirkstoffe wie therapeutisch anwendbare Proteine die Doppel- emulsionsmethode zu bevorzugen. Nachteilig ist, dass bei der Entwicklung der opti-

malen Mikropartikelformulierung unter Umständen sehr viel Zeit investiert werden muss, da der Herstellprozess sehr komplex ist und sehr viele Parameter veränderbar sind.

### 2.2.3 Sprühtrocknung

Die Sprühtrocknung ist im Vergleich mit anderen Methoden ein schnelles und kontinuierliches Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln. Ausgangsmaterial ist, wie bei allen bisher beschriebenen Verfahren, die Polymerlösung, mit dispergiertem oder gelöstem Wirkstoff, oder die Primäremulsion. Durch eine Pumpe wird das Flüssigkeitsgemisch angesaugt und zu einer Zerstäuberdüse geleitet. Durch Versprühen entstehen kleine Tröpfchen, die im warmen Luftstrom aufgrund der Oberflächenvergrößerung und der Lösungsmittelverdampfung rasch trocknen. Die Einlasstemperatur beträgt je nach Lösungsmittel 40 – 70 °C. Die fertigen Mikropartikel werden vom Gasstrom mitgeführt und im Zyklon abgeschieden (Abb. 2.5).

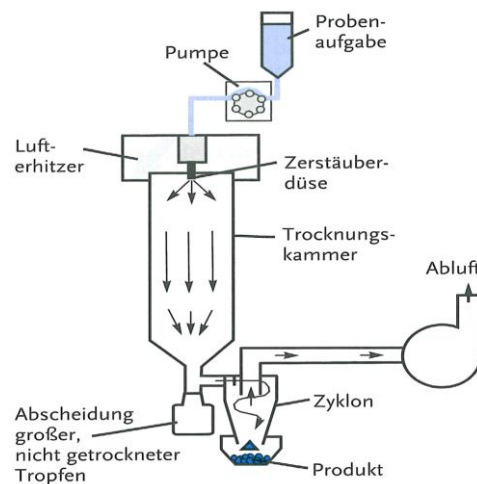


Abb. 2.5: Schematische Darstellung eines Sprühtrockners [Voigt, 2006]

Es werden zwei Trocknungsarten unterschieden. Bei der Gegenstromtrocknung wird der Gasstrom von unten in den Sprühturm eingeleitet. Auf nahezu trockene Partikel trifft heiße Luft, was die Produktstabilität insbesondere bei thermolabilen Stoffen wie Polymeren mit niedrigem Glasübergangspunkt beeinflussen kann. Das Gleichstromverfahren ist daher besser für die Mikropartikelherstellung

geeignet, da der Gasstrom von oben in das System eingebracht wird. Direkt versprühte Tröpfchen treffen auf warme Luft und werden durch die entstehende Verdunstungskälte schonend getrocknet. Mit der Sprühtrocknung können kleine Partikel in der Größenordnung von 10 µm erzeugt werden. Aufgrund ihrer Klebrigkeit neigen die Partikel zu Agglomeration. Um eine enge Korngrößenverteilung zu erreichen, werden vibrierende Zweistoffdüsen eingesetzt, die monodisperse Partikel erzeugen. Durch den zweiten, stabilisatorhaltigen Trägerstrom wird Agglomeration vermieden [Berkland et al., 2001]. Jedoch sind die Ausbeuten besonders bei kleinen Ansätzen sehr schlecht (< 45%). Vorteilhaft ist, dass hohe Verkapselungsraten erzielt werden. Allerdings kann die schnelle Lösungsmittelverdampfung zu einer porösen inneren Struktur der Partikel und somit zu einer hohen initialen Freisetzung des verkapselten Wirkstoffs führen. [Arpagaus et al., 2007].

#### **2.2.4 Überkritisches Gas**

Mit Hilfe von überkritischem Gas wie CO<sub>2</sub> lassen sich mit verschiedenen Verfahren zum Teil sehr schonend Mikropartikel herstellen. Durch Druck- und Temperaturerhöhung (31 °C und 74 bar für CO<sub>2</sub>) lassen sich Gase verflüssigen und können Substanzen wie Polymere lösen. Im sogenannten RESS-Verfahren (rapid expansion of supercritical solutions) werden alle Substanzen im überkritischen Gas gelöst und über eine erwärmte Düse in eine Niederdruckkammer versprüht. Es kommt zu einer schlagartigen Ausbildung von kleinen Partikeln (0,5 – 20 µm). Diese Methode eignet sich sehr gut für die Verkapselung von chemischen Wirkstoffen, jedoch ist die Löslichkeit von Proteinen im überkritischen Gas limitiert [Jung et al., 2001]. Der überkritische Zustand eines Gases kann auch als Nicht-Lösungsmittel verwendet werden. Löst man Polymer und aktive Substanz in einem organischen Lösungsmittel, das sich in überkritischem Gas löst, so kommt es beim Einleiten von flüssigem CO<sub>2</sub> bzw. beim Versprühen der Lösung in flüssigem CO<sub>2</sub> zur Extraktion des Lösemittels und zur Präzipitation von Mikropartikeln [Elvassore et al., 2000]. Ungünstig ist bei diesem Verfahren die Anwendung von organischen Lösungsmitteln. Eine weitere Möglichkeit ist,

Polymer und Wirkstoff mit überkritischem Gas zu sättigen. Dabei löst sich das Polymer wie z.B. PLGA im Gas und ermöglicht, dass der nicht- oder schwerlösliche Wirkstoff dispergiert werden kann. Die Mischung wird durch eine Düse unter Normalbedingungen versprüht, CO<sub>2</sub> verdampft und die Tröpfchen härten aus, so dass Mikropartikel entstehen. Dieses Verfahren nennt sich PGSS (particles from gas-saturated solutions) und wurde bereits erfolgreich für die Verkapselung von Proteinen eingesetzt [Whitaker et al., 2005]. Vorteil dieser Technik ist, dass es sich um einen einstufigen Prozess handelt, der ohne organische Lösungsmittel auskommt. Demgegenüber stehen hohe Anschaffungs- und Betriebskosten sowie ein erhöhter Sicherheitsaufwand beim Umgang mit überkritischen Gasen.



## 2.3 Polymere

Es gibt eine Vielzahl von Polymeren, die sich zur Anwendung am Menschen eignen, da sie vom Körper nicht als Fremdstoff angesehen und somit nicht abgestossen werden. Biokompatibilität besitzen zum Beispiel Silikon oder Poly(ethylen-co-vinylacetat). Hieraus werden häufig Implantate hergestellt, die den Wirkstoff über einen langen Zeitraum freisetzen. Diese Polymere sind jedoch nicht bioabbaubar, so dass das Implantat nach der therapeutischen Anwendung durch einen chirurgischen Eingriff aus dem Körper entfernt werden muss. Für die Mikroverkapselung eignen sich daher Polymere, die vom Körper über hydrolytische oder enzymatische Prozesse metabolisiert werden und nach erfolgter Wirkstoffabgabe nicht entfernt werden müssen. Co-Polymere aus Milchsäure und Glykolsäure gehören dazu. Die sogenannten Polylactid-co-Glycolide (PLGA) werden über Ringöffnungspolymerisation der cyclischen Diester (Lactid und Glykolid) hergestellt und gehören in die Gruppe der thermoplastischen aliphatischen Polyester.

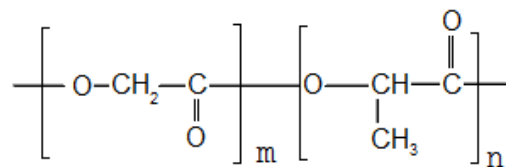


Abb. 2.6: Strukturformel von PLGA

PLGA wird nicht nur für die Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln sowie von Implantaten verwendet, sondern wird auch in der Gewebszüchtung (tissue engineering) und als Nahtmaterial eingesetzt. Von der FDA ist es bereits für diese Zwecke zugelassen. In vitro und in vivo unterliegt PLGA der hydrolytischen Degradation durch Aufspaltung der Esterbindungen in seine Ausgangsstoffe, die im Körper über den Zitronensäurezyklus zu Kohlenstoffdioxid und Wasser verstoffwechselt und ausgeschieden werden. Der Polymerabbau folgt nach Benetzung der Matrix dem Prinzip der Massenerosion von innen nach außen. Anfangs bilden sich wasserunlösliche Abbauprodukte, die das System nicht verlassen können. Der Massenverlust ist daher erst nach einer Verzögerungsphase erkenn-

bar, wenn sich wasserlösliche Oligomere gebildet haben. Hingegen ist der Molekulargewichtsverlust sofort messbar [Cohen et al., 1994]. Durch den Mechanismus der Bulkerosion kommt es zur Ansammlung von Abbauprodukten im Inneren der Arzneiform, die unter Umständen ein saures pH-Mikroklima erzeugen und den eingekapselten Wirkstoff schädigen können [Mäder et al., 1998].

Ein Vorteil der Co-Polymere ist ihre variable Zusammensetzung und somit die Anpassung an den jeweiligen Verwendungszweck. Je höher der Anteil an Glykolsäure im Polymer, desto schneller erfolgt der Abbau. PLGA mit einem Lactid/Glykolid-Verhältnis von 50/50 baut sich in der Regel in ein bis zwei Monaten ab, wohingegen PLGA mit einem Anteil von 85% Milchsäure fast ein halbes Jahr braucht, um zu degradieren [Nair et al., 2007]. Mittlerweile gibt es viele Hersteller, die PLGA in unterschiedlicher Zusammensetzung auf den Markt bringen. Eine kleine Auswahl ist in Tab. 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3: Handelsnamen von PLGA (modifiziert nach [Chang et al., 2011])

Hersteller	Handelsname	Beispiel	Zusammensetzung [%]	
			Lactid	Glykolid
<b>DURECT</b>	Lactel	Lactel 85:15 DL-PLG	85	15
<b>Evonik</b>	Resomer	Resomer RG 504	50	50
<b>PURAC</b>	Purasorb	Purasorb PDLG 5002	50	50
<b>SurModics</b>	-	5050 DLG 5E	50	50

Für diese Arbeit wurden ausschließlich Polymere der Firma Evonik verwendet, die ein Lactid/Glykolid-Verhältnis von 50/50 aufwiesen. Zusätzlich zu den einfachen PLGA-Typen, die nur aus einem Block PLGA bestehen und sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden, gibt es Co-Polymere, die neben PLGA noch Polyethylenglykol enthalten. Hier spricht man von Diblockcopolymeren (Abb. 2.7 wenn  $R = CH_3$ ) oder Triblockcopolymeren (Abb. 2.7 wenn  $R = PLGA$ ).

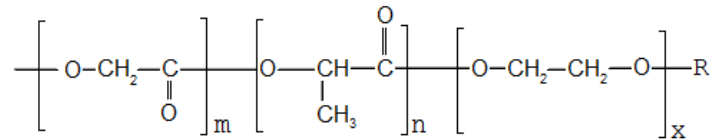


Abb. 2.7: Strukturformel von Co-Polymeren aus PLGA und Polyethylenglykol-PEG (R = CH<sub>3</sub>) und PLGA-PEG-PLGA (R = PLGA)

Die Heteropolymere des Resomer-Portfolios enthalten PEG 6000 in einer Konzentration von fünf bis fünfzehn Prozent der Gesamtmasse. Durch die zusätzliche Komponente werden die physikochemischen Eigenschaften der Polymere verändert. Im Vergleich zu den Monoblockpolymeren ist bei den Di- und Triblockcopolymeren die Glasübergangstemperatur geringer. Außerdem wird in Abhängigkeit des hydrophilen PEG-Anteils die Löslichkeit der Polymere in organischen Lösungsmitteln erschwert und die Interaktion mit Wasser gesteigert. Es wurde gezeigt, dass Triblockcopolymere während der in-vitro Freisetzung eine quervernetzte Hydrogelstruktur aufbauen, durch die der Wirkstoff über Diffusion kontinuierlich freigesetzt wurde [Kissel et al., 2002]. Die heterogenen Typen des PLGA eignen sich sehr für die Mikroverkapselung von hydrophilen Stoffen wie Proteinen und wurden daher in dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzt.

## 2.4 Modellproteine

Proteine sind Makromoleküle, die aus proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sind. Aminosäuren sind Carbonsäuren, die am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom eine Aminogruppe besitzen und somit amphoter reagieren. Für den Proteinaufbau stehen zwanzig verschiedene Aminosäuren zur Verfügung. Durch Kondensation der Aminogruppe eines Moleküls und der Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure entsteht eine Peptidgruppe. Durch diese Reaktion können viele Aminosäuren aneinander gebunden werden und somit zu Proteinen werden (Proteinbiosynthese). Die Aminosäuresequenz eines Proteins wird als Primärstruktur bezeichnet. Da eine gewisse Drehbarkeit der Peptidbindungen in der Sequenz vorherrscht, ist eine Faltung möglich, indem Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Bekannte Strukturen sind  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und  $\beta$ -Schleifen. Die räumliche Struktur eines Proteins wird durch die Tertiärstruktur bestimmt. Zwischen den Seitenketten bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen sowie Disulfidbrücken aus. Ferner sind van-der-Waals-Kräfte, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen am Zusammenhalt der Struktur beteiligt. Viele Proteine bestehen aus mehreren Polypeptidketten, die zu einer Funktionseinheit zusammen geschlossen werden. Die Anordnung der Ketten zueinander ist die Quartärstruktur. Sie wird sowohl über Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen als auch über kovalente Bindungen stabilisiert. Zusätzlich können nicht-peptidische Gruppen wie komplex gebundene Metall-Ionen in der Struktur vorhanden sein (prothetische Gruppen). Hämoglobin zum Beispiel besteht aus vier Peptidketten, die jeweils einen eisenhaltigen Chelatkomplex (Hämgruppe) miteinschließen. Proteine sind für den menschlichen Körper essentiell, da sie viele Funktionen und Aufgaben erfüllen. Eine Auswahl ist in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Einteilung verschiedener Proteinklassen nach Funktion

Proteinklasse	Aufgabe	Beispiel
<b>Antikörper</b>	Bestandteil des Immunsystems	Immunglobulin G
<b>Enzyme</b>	Katalysator chemischer Reaktionen	Trypsin
<b>Gerinnungsfaktoren</b>	Hämostase	Thrombin
<b>Hormone</b>	Signalübertragung	Follitropin (FSH)
<b>Speicherproteine</b>	Einlagerung von Stoffen	Ferritin
<b>Strukturproteine</b>	Aufbau von Zellen	Kollagen
<b>Transportproteine</b>	Transport von Stoffen durchs Blut	Hämoglobin
<b>Zytokine</b>	Wachstum und Differenzierung von Zellen	TNF- $\alpha$

Proteine unterscheiden sich nicht nur in ihrer Funktion, sondern auch in ihrer Primärstruktur, ihrem Molekulargewicht und ihren physikochemischen Eigenschaften voneinander. Das stellt große Herausforderungen an die Formulierungsentwicklung von therapeutisch wirksamen Proteinen dar. Jedes Protein ist einzigartig und reagiert anders auf äußere Einflüsse wie Temperatur, Licht oder Scherung. Wurde ein Protein erfolgreich in einem System stabilisiert, so kann sich ein anderes Protein unter den gleichen Bedingungen auffalten und ausfallen. Aus diesem Grund war es wichtig, dass Mikropartikel auf Basis unterschiedlicher Proteine hergestellt wurden und ihre Stabilität überprüft wurde. Es wurden drei Modellproteine ausgewählt, die sich in ihrer Größe und in ihren physikochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden.

### 2.4.1 Lysozym

Lysozym kommt im Körper vor allem in Sekreten wie Speichel vor und ist an der Immunabwehr beteiligt. Es ist ein Enzym, das die Zellwand von grampositiven Bakterien aufspaltet. Das in dieser Arbeit verwendete Lysozym wurde aus dem

Eiklar von Hühnereiern gewonnen. Mit einem Molekulargewicht von 16 kDa und einer Primärstruktur von 147 Aminosäuren handelt es sich um ein kleines Proteinmolekül. Der isoelektrische Punkt (IEP) ist der pH-Wert, an dem alle Aminosäuren eines Proteins ungeladen vorliegen. Bei Lysozym liegt der IEP bei 9,4. Das heißt, dass bei einem alkalischen pH-Wert von 9,4 das Protein am geringsten löslich ist und ggf. ausfallen kann. Bei neutralem pH-Wert liegt das Protein hauptsächlich als Kation vor. Lysozym war in den Experimenten Modell für kleine, therapeutisch wirksame Proteine wie Zytokine.

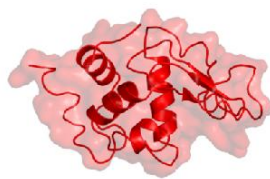


Abb. 2.8: Lysozym des Hühnereiklars [The UniProt Consortium, 2012]

### 2.4.2 Bovines Serumalbumin (BSA)

Serumalbumin ist ein wesentlicher Bestandteil des Blutes und stellt mit 55% den größten Anteil an Plasmaproteinen dar. Es reguliert den onkotischen Druck im Blut und ist hauptverantwortlich für die Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen. Es hat amphiphile Eigenschaften, so dass es als Stabilisator von Proteinformulierungen für die parenterale Applikation eingesetzt wird (humanes Serumalbumin). Bovines Serumalbumin, BSA, ist ein aus 607 Aminosäuren aufgebautes, globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 69 kDa. Bei einem pH-Wert von 5,8 liegt BSA als Zwitterion vor und hat die geringste Löslichkeit in Wasser. Die Stabilisierung des Proteins erfolgt über ein hohes Maß an Disulfidbrücken. In dieser Arbeit diente es als Modell für mittelgroße, therapeutisch wirksame Proteine wie Antikörper-Fragmente oder Blutgerinnungsfaktoren.



Abb. 2.9: Bovines Serumalbumin [The UniProt Consortium, 2012]

### 2.4.3 Monoklonaler Antikörper (IgG)

Antikörper gehören zur Gruppe der Immunglobuline und sind im Körper an der Immunabwehr beteiligt. Wenn Pathogene auftreten, wird ihre Synthese in B-Lymphozyten, die im Blut und in der Lymphe vorkommen, angeregt. Es kommt zur Bindung des Pathogens nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und zur Eliminierung des Fremdstoffs.

In Abb. 2.10 ist die Struktur eines IgG-Antikörpers abgebildet.

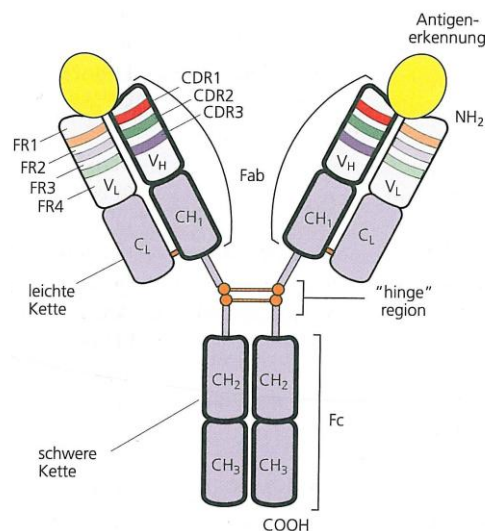


Abb. 2.10: Struktur eines Antikörpermoleküls (IgG) [Wagner et al., 2007]

Ein Immunglobulin G hat eine Y-förmige Struktur und ist aus vier Proteinketten aufgebaut. Zwei identische leichte Ketten (L) bestehen aus einer variablen (V<sub>L</sub>) und einer konstanten Domäne (C<sub>L</sub>). Die beiden identischen schweren Ketten (H)

besitzen hingegen drei konstante Domänen ( $CH_{1-3}$ ) und eine variable Region ( $V_H$ ). Über Disulfidbrücken werden die Ketten zusammengehalten. Als CDR-Bereiche bezeichnet man die Antigenerkennungs- und Bindungsstelle in den variablen Regionen der schweren Ketten. Die variablen Bereiche der leichten Ketten ( $FR$ ) verleihen Stabilität. Die konstanten Bereiche der schweren Ketten sind für die Signaltransduktion zuständig und leiten somit die Immunantwort auf das Pathogen ein. Das antigenbindende Fab-Fragment und der kristallisierbare Fc-Teil werden über eine Gelenkregion zusammengehalten, die der Struktur eine hohe Beweglichkeit verleiht. Beim Menschen gibt es vier verschiedene Subtypen des Immunglobulin G, die sich alle in ihrer schweren Kette unterscheiden.

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper ist ein für die therapeutische Anwendung entwickeltes Immunglobulin G vom Isotyp 1. Er hat ein Molekulargewicht von 150 kDa und wird in der Onkologie zur Behandlung von Brustkrebs sowie Gehirn- und Halstumoren eingesetzt. Diese Tumore exprimieren eine Variante des Glykoproteins CD44 auf ihrer Oberfläche, das vom therapeutischen Antikörper erkannt und bekämpft wird [Rupp et al., 2007; Sauter et al., 2007]. Das Immunglobulin war Modell für große Proteine wie andere therapeutisch anwendbare Antikörper.



## **3 METHODEN**

### **3.1 Herstellung von Mikropartikeln**

#### **3.1.1 Proteinlösung (wässrige Phase)**

Von dem jeweiligen Modellprotein wurde eine hochkonzentrierte Lösung hergestellt. BSA und Lysozym lagen als Lyophilisat vor, so dass 200 mg Protein eingewogen wurden und in 1000  $\mu$ L Phosphatpuffer (67 mM; pH 7,4) gelöst wurden.

Der verwendete Antikörper lag als Lösung mit einer Konzentration von 84 mg/mL in Phosphatpuffer (67 mM; pH 6,2) vor. Für die Produktion der Mikropartikel im Labormaßstab war diese Konzentration ausreichend. Für die Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab wurde die Antikörper-Lösung auf eine Konzentration von 200 mg/mL mit Hilfe einer Zentrifugenfiltereinheit (Amicon®) aufkonzentriert.

#### **3.1.2 Polymerlösung (organische Phase)**

Für die Herstellung von Mikropartikeln wurde eine 9,1% ige (m/m) Lösung des jeweiligen Polymers verwendet. Die entsprechende Menge Polymer wurde eingewogen und mit Dichlormethan versetzt. Mit Hilfe eines Minishakers wurde das Polymer gelöst. In Abhängigkeit des verwendeten Homogenisiergeräts wurden unterschiedliche Gefäße zur Herstellung der Polymerlösung verwendet (siehe Tab. 3.1). Für das Polymerscreening wurden binäre Mischungen aus Polymer und PEG hergestellt. PEG wurde zusammen mit dem Polymer eingewogen und in Dichlormethan gelöst.

Tab. 3.1: Herstellung Polymerlösung

Homogenisier- gerät	Gefäß	Menge	Volumen	Maßstab
		Polymer [mg]	Dichlormethan [mL]	
<b>Ultraturrax</b>	Reagenzglas	243/425	2/3,5	Labor
<b>Ultraschall</b>	PP-Röhrchen (50mL)	243/425	2/3,5	Labor
<b>Ultraschall</b>	PP-Röhrchen (50mL)	2430	20	technisch

### 3.1.3 Äußere Phase

Für die Herstellung von Mikropartikeln wurden verschiedene äußere Phasen eingesetzt (Tab. 3.2). Gängig ist die Verwendung von Polyvinylalkohol, um die nativen Mikropartikel zu stabilisieren. Als Alternative wurde Methylcellulose als Stabilisator angewendet. Es wurden wässrige Lösungen hergestellt. Zum Teil wurde die äußere Phase noch mit Sorbitol in verschiedenen Konzentrationen angereichert.

Tab. 3.2: Äußere Phase

Substanz	Konzentration	Volumen
	[%] (m/V)	[mL]
<b>PVA</b>	0,6	50
<b>PVA</b>	6,0	45
<b>Methylcellulose</b>	2,75	45
<b>Methylcellulose</b>	3,5	350

### 3.1.4 Herstellung der Primäremulsion

Entsprechend Tab. 3.3 wurde die Proteinlösung zu der Polymerlösung gegeben und mittels Ultraturrax oder Ultraschall homogenisiert.

Tab. 3.3: Abhängigkeit des Volumens der Proteinlösung von der Polymermenge

Menge Polymer [mg]	Volumen Protein- lösung [μL]	Homogenisier- gerät	Homogenisierparameter	
			Stärke	Zeit [s]
<b>243</b>	74	Ultraturrax	7200 U/min	30
<b>243</b>	74	Ultraschall	60 W	30
<b>425</b>	150	Ultraturrax	7200 U/min	30
<b>425</b>	150	Ultraschall	60 W	30
<b>2430</b>	740	Ultraschall	120 W	60

### 3.1.5 Herstellung von Mikropartikeln im Labormaßstab

Die äußere Phase wurde in einem 150 mL Becherglas vorgelegt. Der Flügelrührer (FR) wurde auf eine Geschwindigkeit von 1000 U/min eingestellt, und die W/O-Emulsion aus Protein- und Polymerlösung wurde mittels Messpipette hinzugegeben. Die Doppelemulsion wurde für 15 min oder 1 h gerührt. Anschließend wurde die Suspension auf dem Magnetrührer (MR) bei 300 U/min für mindestens 1 h gerührt, so dass eine Gesamt-Rührzeit von mindestens 2 h erreicht wurde. Jede Formulierung wurde mindestens drei Mal hergestellt mit Ausnahme der Formulierungen der statistischen Versuchsplanung, die jeweils nur einmal produziert wurden.

### 3.1.6 Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab

Die äußere Phase wurde in das Reaktionsgefäß eingefüllt und die Apparatur mit Deckel verschlossen. Das Abstreiferrührwerk wurde auf eine Geschwindigkeit von 100 U/min und der Homogenisator auf 1500 U/min eingestellt. Die Primäremulsion wurde über eine Öffnung im Deckel mit Hilfe einer Messpipette in die äußere Phase eingebracht. Die Doppelemulsion wurde für 3 h gerührt.

### 3.1.7 Gewinnung von Mikropartikeln

Die Gewinnung der Mikropartikel erfolgte über Filtration oder Zentrifugation.

#### 3.1.7.1 Filtration

Die Mikropartikel-Suspension wurde über einen 0,45 µm Membranfilter gegeben und der Rückstand mit 40 mL G-Wasser gewaschen. Das Filterpapier mitsamt der Mikropartikel wurde in eine Petrischale überführt.

#### 3.1.7.2 Zentrifugation

Jeweils 50 g Mikropartikel-Suspension wurden in ein konisch zulaufendes PP-Röhrchen (50 mL) gegeben und für 10 min bei 1200 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Der Rückstand wurde mit restlicher Mikropartikel-Suspension bzw. mit G-Wasser auf 65 g Gesamtgewicht aufgefüllt und erneut für 10 min bei 1200 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt, wobei die Zentrifugation im letzten Schritt bei 1700 min<sup>-1</sup> für 20 min erfolgte. Der Rückstand wurde ausgewogen und mit G-Wasser auf ein Gesamtgewicht von 4 g verdünnt. Die gereinigte Mikropartikel-Suspension wurde in Glasvials abgefüllt.

### 3.1.8 Trocknung von Mikropartikeln

Die Mikropartikel-Filterkuchen und die –Suspensionen wurden unter folgenden Bedingungen im Gefriertrockner Christ lyophilisiert:

Vorfrieren der Platten:	2 h mind. – 30 °C
Einfrieren:	2 h bei Atmosphärendruck und RT
Haupttrocknung:	20 h bei 1,03 mbar und 0 °C
Nachtrocknung:	mind. 2 h im Vakuumschrank bei < 100 mbar und RT

Für die Trocknung der Mikropartikel-Formulierungen der Lagerstabilität wurde anders vorgegangen. Die Mikropartikel-Suspensionen wurden nach der Herstellung im Gefrierschrank bei – 70 °C eingefroren und nach maximal drei Wochen

der Lyophilisation im Gefriertrockner Tiny unter folgenden Bedingungen unterzogen:

Vorfrieren der Platten:	2 h bei – 45 °C
Einfrieren:	6 h bei Atmosphärendruck und – 45 °C innerhalb von 45 min auf – 25 °C erwärmen
Haupttrocknung:	innerhalb von 30 min auf 0,2 mbar und – 25 °C 66 h bei 0,2 mbar und 0 °C
Nachtrocknung:	25 h bei 0,2 mbar und 25 °C

## **3.2 Partikelcharakterisierung**

Die im Folgenden genannten Methoden wurden routinemäßig bei allen hergestellten Chargen von Mikropartikeln angewendet. Diese bilden die Kenndaten zur Charakterisierung der Formulierungen.

### **3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie**

Bei der Rasterelektronenmikroskopie werden Objekte mit Hilfe von Elektronenstrahlen vergrößert dargestellt. Die Elektronen werden durch eine Glühkathode (erhitzter Wolframdraht) erzeugt und im elektrischen Feld beschleunigt. Im Hochvakuum werden die emittierten Elektronen zu einem Strahl gebündelt und auf einen Punkt der Probe fokussiert. Etappenweise wird die gesamte Oberfläche der Probe abgerastert. Durch Auftreffen des Primärelektronenstrahls auf die zuvor mit einer Metallschicht überzogene Probe werden Sekundärelektronen aus der Probe herausgeschlagen. Das Signal wird am Detektor verstärkt und in ein Bild umgewandelt.

Zur morphologischen Charakterisierung der Mikropartikel wurde eine Spatelspitze Pulver auf einen leitfähigen Kohle-Haftaufkleber, der zuvor auf einen Aluminium-Stiftprobenteller geklebt wurde, aufgebracht und verteilt.

Für Querschnittsaufnahmen wurden zwei Probenhalter mit einer dünnen Schicht Cyanacrylat (Sekundenkleber) bestrichen. Die Mikropartikel wurden auf einen Probenhalter gestreut. Der andere wurde darauf geklebt. Die Proben wurden über

Nacht (ca. 18 h) stehen gelassen, damit das Cyanacrylat aushärten konnte. Beide Probenhalter wurden voneinander getrennt. Der untere Probenteller, auf den die Mikropartikel aufgebracht wurden, wurde zum Mikroskopieren verwendet.

Die Proben wurden unter folgenden Bedingungen mit Gold besputtert:

Zeit:	90 s + 60 s
Strom:	20 A
Druck:	0,05 mbar
Rotation:	Stufe 2

Die Spannung an der Kathodenheizung betrug 5 kV.

In der Regel wurden Übersichtsaufnahmen bei 200-facher oder 500-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die Betrachtung einzelner Partikel, der Oberfläche oder der inneren Morphologie wurden Vergrößerungen von 1000 bis 5000 gewählt.

### **3.2.2 Partikelgrößenverteilung**

Die Partikelgrößenanalyse basiert auf dem Prinzip der Laserlichtbeugung. An den in der Suspension oder in der Luft dispergierten Partikeln wird ein Laserstrahl gebeugt und erzeugt ein charakteristisches Beugungsmuster. Kleine Partikel beugen das Licht stärker und erzeugen große Beugungsringe von geringer Intensität. Da die Partikeldurchmesser größer als die Wellenlänge des Laserlichts sind, die Partikel lichtundurchlässig sind und der Teilchenabstand fünf Mal größer ist als der Partikeldurchmesser, korrelieren gemäß Fraunhofer-Theorie Lichtintensität und Partikeldurchmesser. Für eine Mischung von Partikeln verschiedener Durchmesser müssen die Intensitäten, welche von einem Detektor gemessen werden, gewichtet werden. Über einen mathematischen Algorithmus auf Grundlage theoretischer Beugungsmuster wird die Partikelgrößenverteilung erstellt [Klank, 2007].

Es wurde eine Nassdispersion durchgeführt. Dazu wurden Mikropartikel zu einer wässrigen 0,2% igen Polysorbat 80 Lösung gegeben bis eine optische Konzentration von 5% angezeigt wurde. Für die Bestimmung der Partikelgrößenänderung während der in-vitro Freisetzung wurde die gesamte Probe (5 mL) in 45 mL Dispergiermedium suspendiert. Während der Messung wurde die Suspension gerührt. Zum Zerteilen von Agglomeraten wurde die Suspension für 30 s mit Ultraschall (60 W) behandelt. Nach einer Pause von 15 s wurde die Messung begonnen. Zuvor wurde eine Background-Messung durchgeführt. In der Regel wurde die Partikelgröße als mittlerer, volumenbezogener Durchmesser (VMD) angegeben. In manchen Fällen wurde zusätzlich die Partikelgrößenspannweite genannt, die sich aus der Differenz aus  $D_{10}$  und  $D_{90}$  dividiert durch  $D_{50}$  errechnet. Jede Probe wurde drei Mal vermessen.

### 3.2.3 Verkapselungsrate

Die Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration in den Mikropartikeln erfolgte mit dem BCA-Assay. Zweiwertige Kupferionen reagieren im alkalischen Milieu quantitativ mit den Peptidbindungen des Proteins zu einem Chelatkomplex. Die entstandenen einwertigen Kupferionen reagieren mit Bicinchoninsäure zu einem stabilen, violett-farbenen Chelatkomplex, der bei 562 nm photometrisch detektiert wird [Smith et al., 1985].

Es wurden 10 mg Mikropartikel in ein 10 mL Glasvial eingewogen und mit 1 mL Natronlauge (1 N) versetzt. Die Proben wurden bei 200 U/min auf einem Horizontalschüttler für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, so dass das Polymer hydrolytisch gespalten wurde. Anschließend wurden 3 mL Phosphatpuffer (67 mM; pH 7,4) und 1 mL Salzsäure (1 N) hinzugegeben. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mittels BCA-Assay und Zugrundelegung einer Kalibriergeraden aus verschiedenen Konzentrationen des eingesetzten Proteins ermittelt. Es wurden 25  $\mu$ L Standard- oder Probelösung pro Vertiefung in eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200  $\mu$ L BCA-Reagenz versetzt. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C im Mikrotiterplatten-Lesegerät inkubiert und anschließend automatisch bei 562 nm photometrisch vermessen. Pro Charge wurde die Bestim-

mung dreifach durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

### **3.2.4 In-vitro Freisetzung**

Die In-vitro Freisetzung der Mikropartikel erfolgte mit unterschiedlichen Freisetzungsmethoden. Für die Charakterisierung der initialen Freisetzung, also die Freisetzung des Wirkstoffs, die innerhalb der ersten 24 h erfolgt (initial burst), wurde in vielen Fällen die Freisetzungsapparatur von Sotax verwendet. Für die in-vitro Freisetzung des Wirkstoffs über einen Zeitraum von Wochen bzw. Monaten wurde die Freisetzungsmethode im Glasvial gewählt.

#### **3.2.4.1 In-vitro Freisetzung im Glasvial**

Es wurden 50 mg Mikropartikel in ein 10 mL Glasvial eingewogen und in 5,0 mL Freisetzungspuffer II (0,4 mol; pH 7,4)<sup>1</sup> suspendiert und mit einem Stopfen verschlossen. Bei 37,2 °C wurden die Proben im Wasserbad inkubiert. Die Probenahme erfolgte mit 1 ml Spritzen. Es wurden jeweils 700 µl Probe aufgezo- gen und durch einen Millex-HV<sub>4</sub>-Filter in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Das entnommene Volumen wurde jeweils durch frisches Medium ersetzt. Sofort nach Zugabe des Mediums zu den Mikropartikeln wurde der Startwert ent- nommen. Nach 24 h und nach 48 h Inkubation wurden weitere Proben gezogen. Die weiteren Probenahmen erfolgten wöchentlich oder vierzehntägig bis zur kompletten Freisetzung des Wirkstoffs oder darüber hinaus. Die Proben wurden bis zur Analyse im Kühlschrank bei 2 bis 8 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration in den Freisetzungsproben wurde mittels BCA-Assay und Zugrundelegung einer Kalibriergeraden aus verschiedenen Konzentrationen des eingesetzten Proteins ermittelt.

---

<sup>1</sup> Für das Polymerscreening wurde Freisetzungspuffer I (67 mM; pH 7,4) ver- wendet.



Pro Formulierung wurde die Freisetzung dreifach angesetzt. Jede Freisetzungssprobe wurde mittels BCA-Assay drei Mal analysiert.

### 3.2.4.2 Freisetzung mittels Freisetzungsapparatur

Bei der Freisetzungsapparatur handelt es sich um eine Durchflusszelle, die im amerikanischen Arzneibuch im Kapitel <711> Dissolution unter Apparatus 4 beschrieben ist. Die Anlage besteht aus dem Auflösungsprüfgerät, einer Hubkolbenpumpe und einem Fraktionssammler. Das Gerät eignet sich sowohl für schnell freisetzende Arzneiformen wie Tabletten als auch für Suppositorien, Pulver und langwirksame Implantate. Für die unterschiedlichen Darreichungsformen werden verschiedene Zelltypen angeboten. In Abb. 3.1 ist eine Prü fzelle für Tabletten abgebildet, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Zelle wird von unten nach oben mit dem Freisetzungsmedium durchspült. In die Zelle werden Glaskugeln und eine Rubinkugel gegeben, damit eine laminare Strömung erzeugt wird und keine Verwirbelungen auftreten. An der Austrittsöffnung wird die Zelle mit einer Filtereinheit verschlossen, um nicht-lösliche Matrixbestandteile zurückzuhalten. Von außen ist die Zelle mit einem Zellmantel umschlossen, der mit temperiertem Wasser gefüllt wird. Jede Zelle wird aus einem eignen Vorratsgefäß mit Medium versorgt.

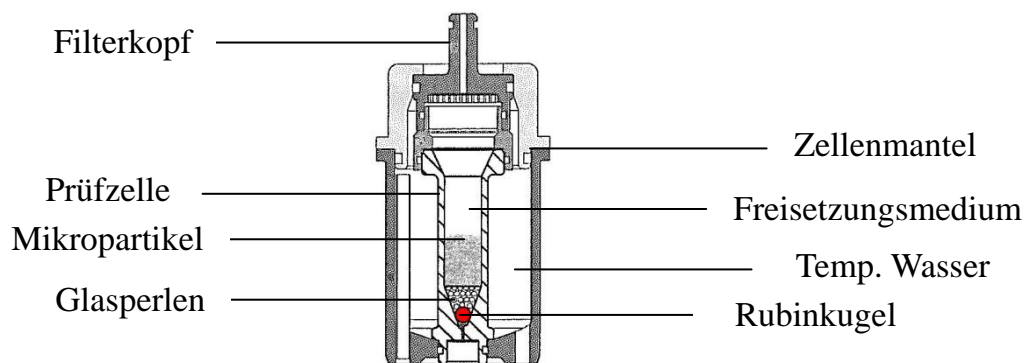


Abb. 3.1: Schematische Abbildung einer Durchflussfreisetzungszelle

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik war ein geschlossenes System, da immer das gleiche Volumen an Freisetzungsmedium durch die Zelle zirkulierte. Es wurde kein frisches Medium hinzugegeben und nach Probenahme wurde das fehlende Medium nicht ersetzt.

Jeweils 50,0 mL Freisetzungsmittel wurden in eine 100 mL Duranglasflasche gefüllt, mit einem Magnetrührkern versehen und auf 37 °C temperiert.

### Anlagenparameter:

Fluss:	4,0 mL/min
Temperatur Wasserbad:	38 °C ± 0,5 °C
Zellentyp:	Tablettenzelle, Volumen 6 mL, ø 12 mm; gefüllt mit 1 Rubinkugel + 2 Spatel Glasperlen
Dissolutionmedium:	Freisetzungspuffer II <sup>2</sup>
Temperatur	
Dissolutionmedium:	37 °C
Magnetrührplatte:	Rührstufe 2; Heizstufe 8
Probenahmevolumen:	200 µL
Probegefäß:	Glasvial für HP-SEC
Probenahme:	1 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h

Die Proben wurden bis zur Analyse im Kühlschrank bei 2 bis 8 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration in den Freisetzungspuren wurde mittels BCA-Assay und Zugrundelegung einer Kalibriergeraden aus verschiedenen Konzentrationen des eingesetzten Proteins ermittelt.

Pro Formulierung wurde die Freisetzung dreifach angesetzt. Jede Freisetzungspure wurde mittels BCA-Assay drei Mal analysiert.

---

<sup>2</sup> Für das Polymerscreening wurde Freisetzungspuffer I (67 mM; pH 7,4) verwendet.

### **3.3 Ergänzende Analysenmethoden**

Die im Folgenden aufgeführten Methoden wurden nicht standardmäßig durchgeführt. Es sind Methoden, die bei ausgewählten Formulierungen angewendet wurden und somit nicht zu den Kenndaten einer Formulierung gehörten.

#### **3.3.1 Konfokalmikroskopie**

Die Konfokalmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie. Durch das Einbringen von Lochblenden in den Strahlengang finden die Beleuchtung und die Detektion der Probe lediglich im Fokuspunkt statt und nicht wie beim Lichtmikroskop zusätzlich außerhalb der Fokalebene. Durch Ausblendung des Signals aus nicht fokussierten Bereichen verbessert sich die Auflösung (in der Regel halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts). Da gegenwärtig nur ein Punkt der Probe abgebildet wird, muss die Probe mit einem Laser abgerastert werden, um ein vollständiges Bild zu erzeugen. Werden Fluoreszenzfarbstoffe in die Probe eingearbeitet, regt der Laserstrahl diese an und bietet die Möglichkeit z.B. Zellprozesse sichtbar zu machen [Römpp Online Version 3.4].

Um die Proteinverteilung in Mikropartikeln abzubilden, wurden Mikropartikel hergestellt, die mit FITC-markiertem BSA beladen waren. Die Mikropartikel wurden in Miglyol 812 dispergiert und mikroskopiert.

#### **3.3.2 Spezifische Oberfläche**

Die spezifische Oberfläche ausgewählter Mikropartikel-Formulierungen wurde mittels Gasadsorption gemäß Kapitel 2.9.26 des Europäischen Arzneibuchs [Ph. Eur. 7, 2012] bestimmt. Gas adsorbiert an der Oberfläche des Materials und bildet eine multimolekulare Schicht aus. Mit Hilfe der BET-Gleichung lässt sich aus der Adsorptionsisotherme (Beziehung zwischen adsorbierter Gasmenge und dem Relativdruck bei konstanter Temperatur) eine Gerade bilden, die den Bereich der monomolekularen Adsorption des Gases abbildet. Aus der Steigung und dem Ordinatenabschnitt wird die Oberfläche der Probe berechnet [Brunauer et al., 1938].

Vor der Bestimmung wurden die Proben für 24 h im Vakuum bei Raumtemperatur entgast. Die Analyse wurde mit Krypton als Adsorbat und einer Temperatur von 77 K durchgeführt. Die Daten der sieben-Punkt-Messung wurden mittels BET-Gleichung ausgewertet. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

### **3.3.3 Restwassergehalt nach Karl Fischer**

Die coulometrische Bestimmung des Wassergehalts nach Karl Fischer basiert auf der Reduktion von Iod durch Schwefeldioxid, die nur in Anwesenheit von Wasser stattfindet. Die Titration erfolgte nach der in Kapitel 2.5.12 beschriebenen Methode des Europäischen Arzneibuchs [Ph. Eur. 7, 2012].

Für die Analyse wurden 200 mg Mikropartikel mittels Ultraturrax im Lösungsmittelgemisch (Methanol/Formamid 70/30) dispergiert und gegen Iod titriert.

### **3.3.4 Proteinintegrität**

Die Proteinintegrität wird mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt. Die Proben werden mit Natriumdodecylsulfat versetzt, das sich an die Peptidketten der Proteine lagert. Die negative Aufladung der Proteine erzeugt ein relativ einheitliches Verhältnis von Proteinladung zu Proteinmasse. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die Proteine gemäß ihrer Masse durch das Gel. Kleine Proteine migrieren rasch durch die Poren des Gels, während große Proteine zurückgehalten werden und langsamer wandern. Anschließend werden die Proteine auf dem Gel fixiert und das Natriumdodecylsulfat entfernt. Mit Silbernitrat werden die Proteine sichtbar gemacht, indem die Silberionen sich an die negativen Peptidbindungen anlagern und durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert werden. Das Trennmuster auf dem Gel gibt Aufschluss über den Zustand des eingesetzten Proteins und ob Aggregate und/oder Fragmente während der Herstellung und der Freisetzung entstanden sind.

Die Proteinintegrität wurde aus den in-vitro Freisetzungspuren bestimmt. Dazu wurden die Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration verdünnt und mit NuPage LDS Probenpuffer sowie Dithiothreitol (zur Reduzierung von Disulfid-

brücken) oder Jodacetamid versetzt und erhitzt. Zusammen mit einer Empfindlichkeitskontrolle (5 ng BSA) und einem Molekulargewichtsproteinstandard (Molekularmarker) wurden die Proben auf ein BIS-TRIS-Gel aufgetragen. Als Elektrolyt wurde MES-Puffer für die Modellproteine Lysozym und BSA sowie MOPS-Puffer für den Antikörper eingesetzt. Die Gele wurden mit dem NuPage SilverXpress Kit für Silberfärbung entwickelt und ausgewertet.

### 3.3.5 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die dynamische Differenzkalorimetrie ist ein thermoanalytisches Verfahren und gibt Auskunft über Veränderungen des Materials in Abhängigkeit der Temperatur. So können mit diesem Verfahren zum Beispiel die Schmelz- oder Glasübergangstemperatur, die Zersetzungskinetik einer festen Arzneiform oder die Stabilität von kristallinen oder amorphen Substanzen bestimmt werden.

Es wurden 10 – 15 mg Mikropartikel in einen Aluminium-Standardtiegel eingewogen und versiegelt. Der Tiegel wurde vor der Messung automatisch angestoßen. Unter nachstehenden Bedingungen wurde die Probe analysiert:

Heizphase 1: 10 °C bis 125 °C mit einer Heizrate von 5 K/min

Kühlphase: 125 °C bis 10 °C mit einer Kühlrate von 10 K/min

Heizphase 2: 10 °C bis 125 °C mit einer Heizrate von 5 K/min

Die Auswertung erfolgte mit der Software STAR® Version 8.10. Es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

### 3.3.6 Lysozymaktivität

Lysozym hat die Eigenschaft, die Zellwand von grampositiven Bakterien zu zersetzen und sie dadurch unschädlich zu machen. Das wird bei Bestimmung der Aktivität ausgenutzt. Eine Lysozymlösung wird mit einer Bakterien-Suspension versetzt. Die Zellwand dieser Bakterien ist aus Peptidoglykanen aufgebaut. Lysozym spaltet die glykosidischen Bindungen und zerstört die Bakterien. Die Abnahme der Absorption der Bakteriensuspension wird photometrisch verfolgt und

über die Steigung der resultierenden Geraden die Aktivität des Proteins berechnet [Shugar, 1952].

Die Aktivität von Lysozym wurde aus den Freisetzungsprouben bestimmt. Die Bakteriensuspension wurde täglich frisch hergestellt, indem 10 mg *Micrococcus lysodeikticus* eingewogen und in 30 mL Phosphatpuffer (67 mM; pH 7,4) dispergiert wurden. Als Standard wurde eine frisch hergestellte Lysozym-Lösung verwendet. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 2,5 µg/mL mit Phosphatpuffer verdünnt. Es wurden 50 µL Standard- oder Probelösung pro Vertiefung in eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µL Bakteriensuspension versetzt. Die Platte wurde bei 26 °C im Mikrotiterplatten-Lesegerät inkubiert. Die Abnahme der Absorption wurde photometrisch bei 450 nm über einen Zeitraum von sieben Minuten automatisch gemessen. Die Aktivität wurde über die Steigung der Geraden (Absorption vs. Zeit) kalkuliert. Unter Einbeziehung der Aktivität des Standards wurden die Aktivitäten der Proben in Prozent berechnet. Jede Probe wurde dreifach vermessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Eine Analysenschwankung von 20% war möglich.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Polymerscreening

Es gibt eine Vielzahl von unterschiedlichen Resomer®-Typen und dazu viele Veröffentlichungen, die sich in der Regel mit zwei oder drei verschiedenen Typen befassen. In diesem Polymerscreening wurde der Einfluss verschiedener Polymertypen auf die Herstellung und Eigenschaften von Mikropartikeln systematisch untersucht. Unter gleichen Bedingungen wurden die Polymere im Labormaßstab zu Mikropartikeln verarbeitet. Das Milchsäure:Glykolsäure-Verhältnis betrug bei allen Polymeren 1:1. Es wurden Monoblockpolymere ausgewählt, die annähernd die gleiche inherente Viskosität wie die Multiblockcopolymere besaßen. Die Polymere unterschieden sich im Wesentlichen durch einen Anteil an Polyethylenglykol. Die eingesetzten Resomertypen sind in Tab. 4.1 aufgeführt.

Tab. 4.1: Zusammensetzung verwendeter Resomer® Typen

Name	Polymertyp	Zusammensetzung	Milchsäure: Glykolsäure	Anteil PEG [%]
<b>RG 504</b>	Monoblock	PLGA	1:1	-
<b>RG 505</b>	Monoblock	PLGA	1:1	-
<b>RGP d 50105</b>	Diblock	PLGA-PEG	1:1	10
<b>RGP d 50155</b>	Diblock	PLGA-PEG	1:1	15
<b>RGP t 50106</b>	Triblock	PLGA-PEG-PLGA	1:1	10

Als Modellprotein wurde BSA eingesetzt. Um den Einfluss von PEG auf die Partikeleigenschaften und die Proteinfreisetzung zu untersuchen, wurde PEG 6000 auf zwei Arten in das System eingebracht: a) in Form eines Di- oder Triblockcopolymers oder b) als physikalische Mischung aus PEG und PLGA in den gleichen Mengenverhältnissen, wie in den jeweiligen Multiblockcopolymeren. Da die eingesetzte Proteinmenge für alle Formulierungen gleich war, führte die niedrigere Menge an Polymer in Formulierung 10 bis 13 zu einer höheren theoretischen BSA-Beladung (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Zusammensetzung der verschiedenen Mikropartikel-Formulierungen

Formu- lierung	Resomer® Typ	Inherente Viskosität Polymer [dl/g]	Menge Polymer [%]	Anteil PEG bezogen auf Polymer- menge [%]	Theor. BSA- Beladung [%]
<b>F1</b>	RGP d 50105	0,72	93,4	-	6,6
<b>F2</b>	RGP d 50155	0,55	93,4	-	6,6
<b>F3</b>	RGP t 50106	0,72	93,4	-	6,6
<b>F4</b>	RG 504	0,50	84,1	10	6,6
<b>F5</b>	RG 504	0,50	79,4	15	6,6
<b>F6</b>	RG 505	0,67	84,1	10	6,6
<b>F7</b>	RG 505	0,67	79,4	15	6,6
<b>F8</b>	RG 504	0,50	93,4	-	6,6
<b>F9</b>	RG 505	0,67	93,4	-	6,6
<b>F10</b>	RG 504	0,50	92,2	-	7,8
<b>F11</b>	RG 504	0,50	91,7	-	8,3
<b>F12</b>	RG 505	0,67	92,2	-	7,8
<b>F13</b>	RG 505	0,67	91,7	-	8,3

Die Ausbeute (durchschnittlich  $84 \pm 4\%$ ) und die Verkapselungsrate (durchschnittlich  $79 \pm 6\%$ ) aller Formulierungen wurden nicht erheblich durch die Verwendung unterschiedlicher Polymertypen und den verringerten Anteil an Polymer in Formulierungen 10 bis 13 beeinflusst. Im Vergleich dazu ließ sich eine Abhängigkeit der Partikelgröße von den eingesetzten Polymertypen beobachten. Mikropartikel, die aus Diblock- oder Triblockcopolymer hergestellt wurden, waren die größten von allen Formulierungen. Die kleinsten Mikropartikel entstanden hingegen aus dem Monoblockpolymer RG 504 (F11). PEG hatte keinen Einfluss auf die Partikelgröße. Mikropartikel, die aus der binären Mischung hergestellt wurden, brachten zwar kleinere Partikel hervor als vergleichbare Formu-



lierungen aus Monoblockpolymer, jedoch war dieser Effekt nicht einhergehend mit der Anwesenheit von PEG sondern mit dem geringeren Polymeranteil. Die Formulierungen 10 bis 13 wurden als Kontrolle mit dem gleichen Anteil an Polymer hergestellt wie die binären Mischungen, nur enthielten sie kein PEG. Die Partikel dieser Formulierungen waren annähernd so groß wie die Partikel der binären Mischungen Formulierung 4 bis 7 (siehe Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Analysenergebnisse der verschiedenen Formulierungen

<b>Formu- lierung</b>	<b>Ausbeute [%]</b>	<b>Verkapselungs- rate [%]</b>	<b>Spezifische Oberfläche (BET) [m<sup>2</sup>/g]</b>	<b>Volumenbezogene, mittlere Partikelgröße [μm]</b>
<b>F1</b>	81 ± 2	78 ± 1	3,62 ± 0,01	121 ± 12
<b>F2</b>	81 ± 1	87 ± 8	8,57 ± 0,07	111 ± 11
<b>F3</b>	77 ± 4	90 ± 4	0,05 ± 0,01	129 ± 10
<b>F4</b>	83 ± 6	78 ± 5	0,10 ± 0,00	78 ± 8
<b>F5</b>	83 ± 4	71 ± 5	0,26 ± 0,00	71 ± 2
<b>F6</b>	81 ± 4	74 ± 3	0,10 ± 0,01	103 ± 12
<b>F7</b>	83 ± 5	82 ± 4	0,24 ± 0,02	100 ± 14
<b>F8</b>	88 ± 2	83 ± 4	0,07 ± 0,01	84 ± 8
<b>F9</b>	87 ± 4	76 ± 3	0,05 ± 0,00	109 ± 7
<b>F10</b>	89 ± 3	77 ± 2	0,09 ± 0,00	69 ± 4
<b>F11</b>	89 ± 4	69 ± 4	0,12 ± 0,00	66 ± 7
<b>F12</b>	86 ± 8	76 ± 6	0,10 ± 0,01	92 ± 5
<b>F13</b>	86 ± 4	81 ± 3	0,08 ± 0,01	90 ± 7

Die Morphologie der Mikropartikel wurde in Abb. 4.1 dargestellt. In der linken Spalte waren Übersichtsaufnahmen bei einer Vergrößerung von 500-fach zu sehen, Detailansichten waren in der rechten Spalte zu erkennen. Die Reihenfolge der Formulierungen von oben nach unten lautete F2, F3, F5 und F8. Mikropartikel, die aus Monoblockpolymer bestanden, waren sphärisch und wiesen eine glatte Oberfläche auf (F8). Die aus einer physikalischen Mischung von PLGA

und PEG hergestellten Mikropartikel waren ebenfalls sphärisch. Die Oberfläche war jedoch von Poren durchzogen (F5). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Poren und dem Porendurchmesser zwischen den Formulierungen mit 10% PEG und 15% PEG. Obwohl bereits bei einer binären Mischung aus 10% PEG und PLGA Poren in den REM-Aufnahmen erkennbar waren, zeigten die Partikel keine Veränderung in der spezifischen Oberfläche ( $\sim 0,1 \text{ m}^2/\text{g}$ ) im Vergleich zu den Monoblockpolymer-Formulierungen (F8 und F9) und den Kontroll-Formulierungen (F10 bis F13). Erst ab einem Anteil von 15% PEG in der physikalischen Mischung stieg die spezifische Oberfläche dieser Formulierungen auf  $0,25 \text{ m}^2/\text{g}$  an (Tab. 4.3).

Die Formulierungen 1 und 2, die aus Diblockcopolymer aufgebaut waren, zeigten nahezu kugelförmige Partikel mit einer rauen Oberfläche. Bei näherer Vergrößerung wurde eine schwammartige Struktur sichtbar. Im Gegensatz dazu brachte die Triblockcopolymer-Formulierung (F3) annähernd sphärische Partikel mit leicht unebener Oberflächenstruktur hervor (Abb. 4.1). Diese Beobachtungen wurden durch die Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen Oberfläche unterstützt. Die Formulierungen aus Diblockcopolymer erreichten die größten spezifischen Oberflächen aller Formulierungen mit  $3,6 \text{ m}^2/\text{g}$  und  $8,6 \text{ m}^2/\text{g}$ , wohingegen Formulierung 3 die geringste spezifische Oberfläche mit  $0,05 \text{ m}^2/\text{g}$  aufwies (Tab. 4.3).

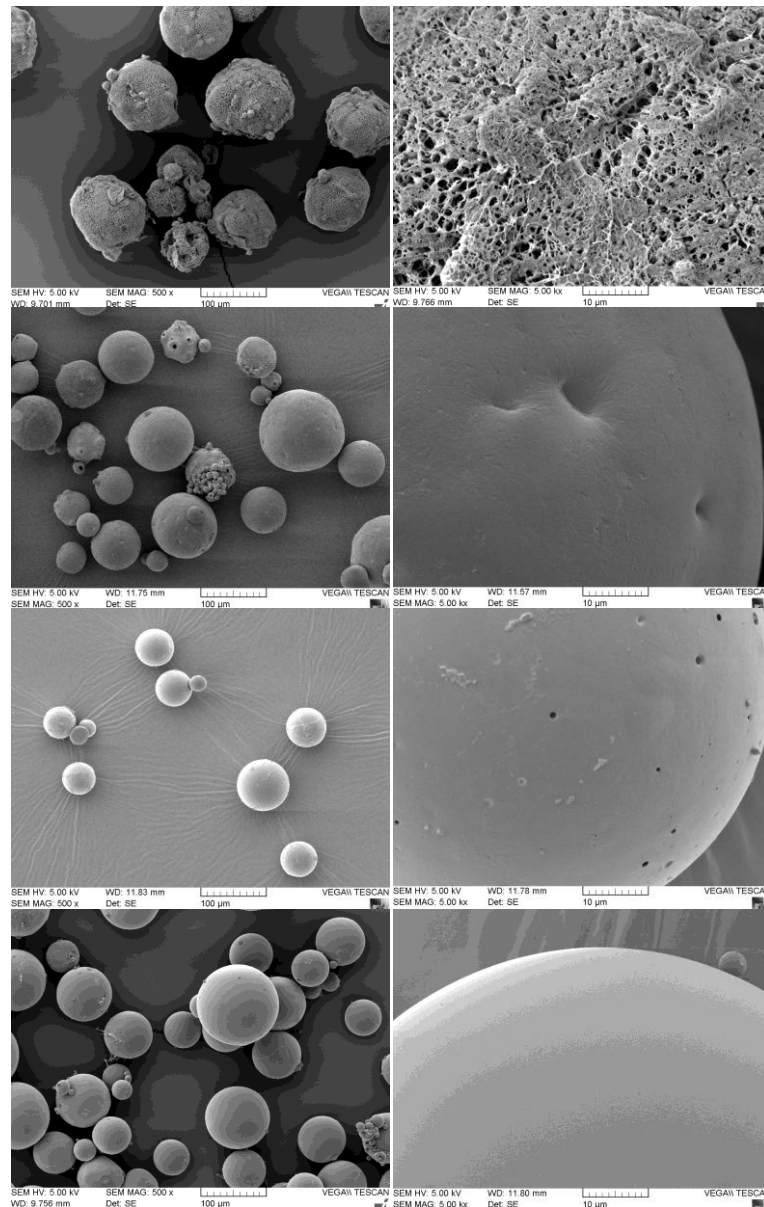


Abb. 4.1: Repräsentative REM-Aufnahmen verschiedener Mikropartikelformulierungen (F2; F3; F5; F8 v.o.n.u.)

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass PEG die Eigenschaft besitzt, Poren in Mikropartikel zu formen. Während der Herstellung konnten sich die PEG-Ketten des Diblockcopolymer in Richtung der inneren und der umgebenden, äußeren wässrigen Phase orientieren und dadurch die schwammartige Struktur ausbilden. Proteine wie BSA sind hydrophil und lagern sich bevorzugt an hydrophile Bereiche wie PEG an. In rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass sich die PEG-Ketten von Diblockcopolymeren hauptsächlich an der Oberfläche von PLA-PEG-Nanopartikeln anordneten und somit zu einer schnell-

leren Freisetzung des Wirkstoffs führten als vergleichbare PLA-Formulierungen [Essa et al., 2010].

Dass die unterschiedlichen Polymertypen und somit die Anwesenheit von Polyethylenglykol einen Einfluss auf die Proteinverteilung im Mikropartikel hatten, zeigten konfokalmikroskopische Aufnahmen (Abb. 4.2).

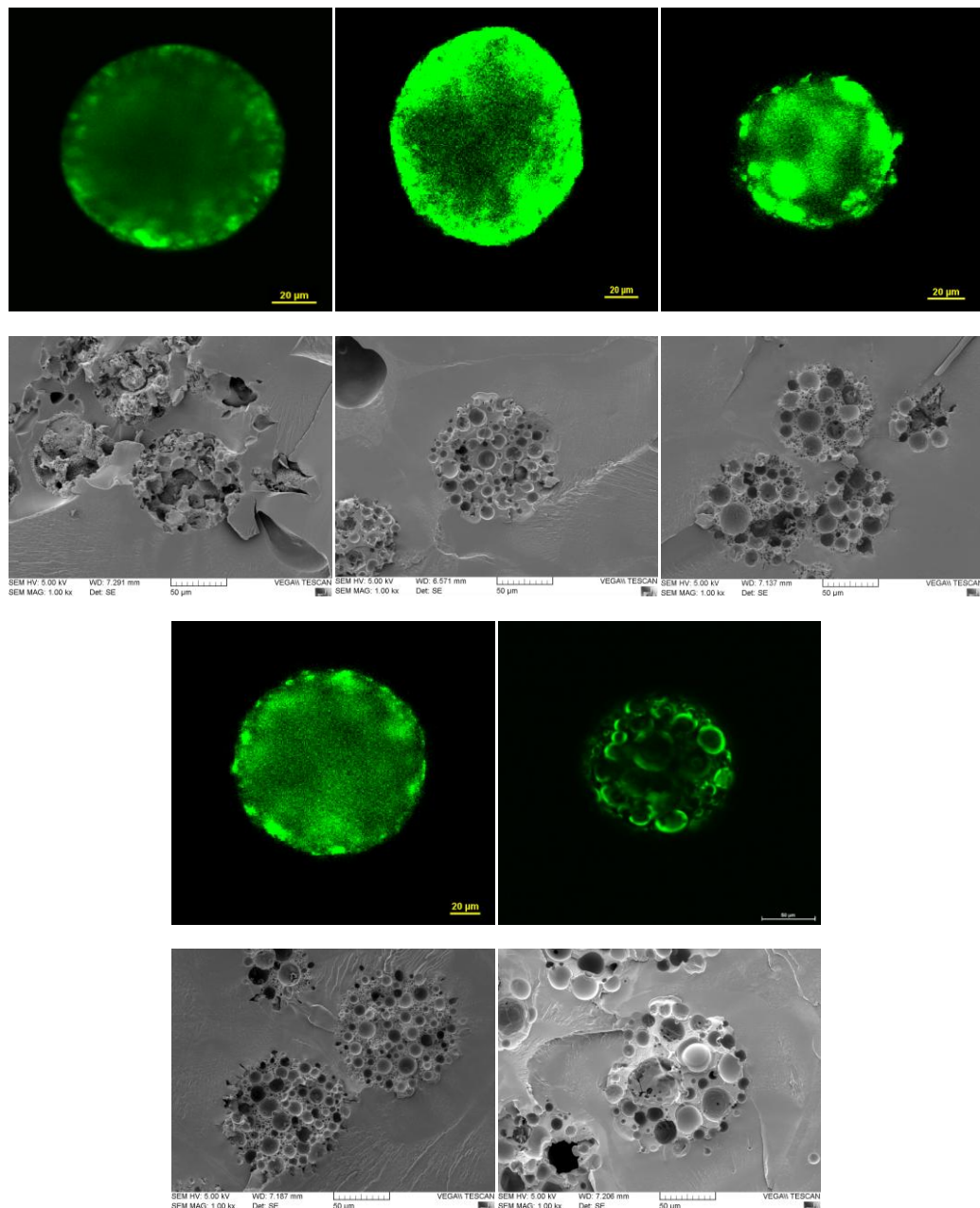


Abb. 4.2: CLSM-Aufnahmen (oben) und REM-Aufnahmen des Partikelquerschnitts (unten) ausgewählter Mikropartikel-Formulierungen (F1; F3; F5; F7; F8 v.l.n.r.)

Die CLSM-Aufnahmen der Di- und Triblockcopolymer-Formulierungen zeigten, dass BSA sich homogen im gesamten Partikel verteilt hat (F1 und F3). Bei den Monoblock-Formulierungen war das Protein an der Grenzfläche zwischen innerer Phase und Polymer lokalisiert. Der Zusatz von PEG führte in Formulierungen 4 bis 7 dazu, dass sich das Protein überall innerhalb der Poren verteilte und sich nicht nur an der Grenzfläche konzentrierte. PEG ist grenzflächenaktiv und lagerte sich an Stelle des Proteins in die Grenzfläche ein, so dass sich das Protein homogen verteilen konnte. Die Vermutung deckte sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie, bei der die Anlagerung von Lysozym an die Wasser/Dichlormethan-Grenzfläche durch die Zugabe von PEG zu der organischen Phase reduziert wurde [Malzert-Fréon et al., 2008]. Es wurde beobachtet, dass die Fluoreszenzintensität des gelabelten Proteins in den äußeren Bereichen aller Mikropartikel-Formulierungen am größten war und im Zentrum der Partikel abgeschwächt wurde. PLGA hat eine sehr hohe optische Dichte, so dass dadurch die optische Sektionierung durch die Mikropartikel erschwert wurde. Die Bilder verloren an Schärfe, jedoch blieb die Struktur und somit der Erkenntnis über die Proteinverteilung erhalten [Lamprecht et al., 2000a]. Die großen Poren ( $> 10 \mu\text{m}$ ), die in den Querschnittsaufnahmen aller Formulierungen sehr gut zu erkennen waren, wurden durch das Herstellverfahren eingebracht [Kim et al., 2004]. Zusätzlich wurden in den Querschnitten der Formulierungen basierend auf binären Mischungen viele kleine Poren ( $< 5 \mu\text{m}$ ) detektiert.

Die Unterschiede in Protein- und Porenverteilung wurden durch die in-vitro Freisetzungsprofile der Formulierungen widerspiegelt. In Abb. 4.3 waren die Freisetzungsdiagramme nach Polymertyp geordnet, beginnend mit den Multiblockcopolymer-Formulierungen, folgend die Formulierungen aus RG 504 und abschließend mit den Formulierungen auf Basis von RG 505. Die Mikropartikel-Formulierungen, die PEG als Hilfsstoff oder als Teil des Polymers beinhalteten, zeigten eine hohe initiale Freisetzung. Generell erfolgte die Freisetzung schneller als vergleichbare Formulierungen ohne Polyethylenglykol. Durch Erhöhung des PEG-Anteils von 10% auf 15% in der Mischung oder im Diblockcopolymer, wurde die Freisetzung des Proteins weiter beschleunigt. Die durch PEG bedingte

poröse Struktur der Partikel und die grenzflächenaktiven Eigenschaften des Polyethylenglykols erleichterten die Benetzung der Partikel und das Eindringen des Freisetzungsmediums durch die Poren, resultierend in einer schnellen Freisetzung des Proteins. Blanco et al. belegte, dass die Zugabe von Poloxamer als PEG-Quelle bei der Herstellung von Mikropartikeln die Interaktion zwischen Protein und Polymer reduzierte und somit das Protein schneller freigesetzt wurde [Blanco et al., 1998]. Die Freisetzung von BSA aus Formulierungen mit 15% PEG (F2, F5, F7) war bereits nach 30 Tagen vollständig. Probenahmen zu späteren Zeitpunkten zeigten, dass die Proteinkonzentration nicht konstant blieb, sondern abnahm. Ursache waren anscheinend Proteinmodifikationen, die mit der Bestimmungsmethode nicht mehr detektierbar waren oder irreversible Adsorption des Proteins an der Polymeroberfläche [Crotts et al., 1997].

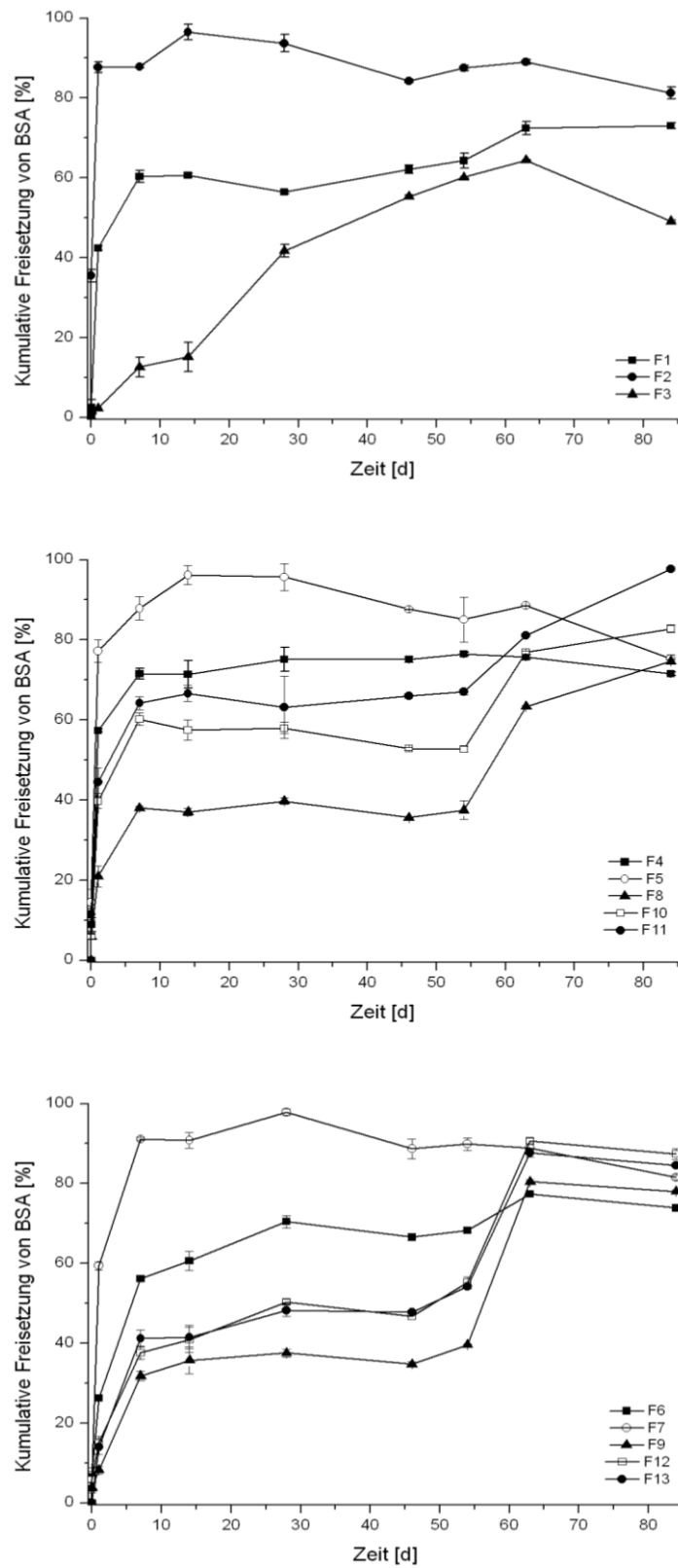


Abb. 4.3: Freisetzungsdiagramme verschiedener Mikropartikel-Formulierungen

Die REM-Aufnahmen in Abb. 4.4 zeigten die Veränderung der Partikelmorphologie während der Freisetzung. Bei Formulierung 4 (physikalische Mischung)

wurde eine Veränderung der Oberfläche nach einer Woche Inkubation beobachtet. Im Vergleich dazu begann die Erosion bei Formulierung 8 basierend auf dem gleichen Monoblockpolymer ohne PEG nach zwei Wochen.

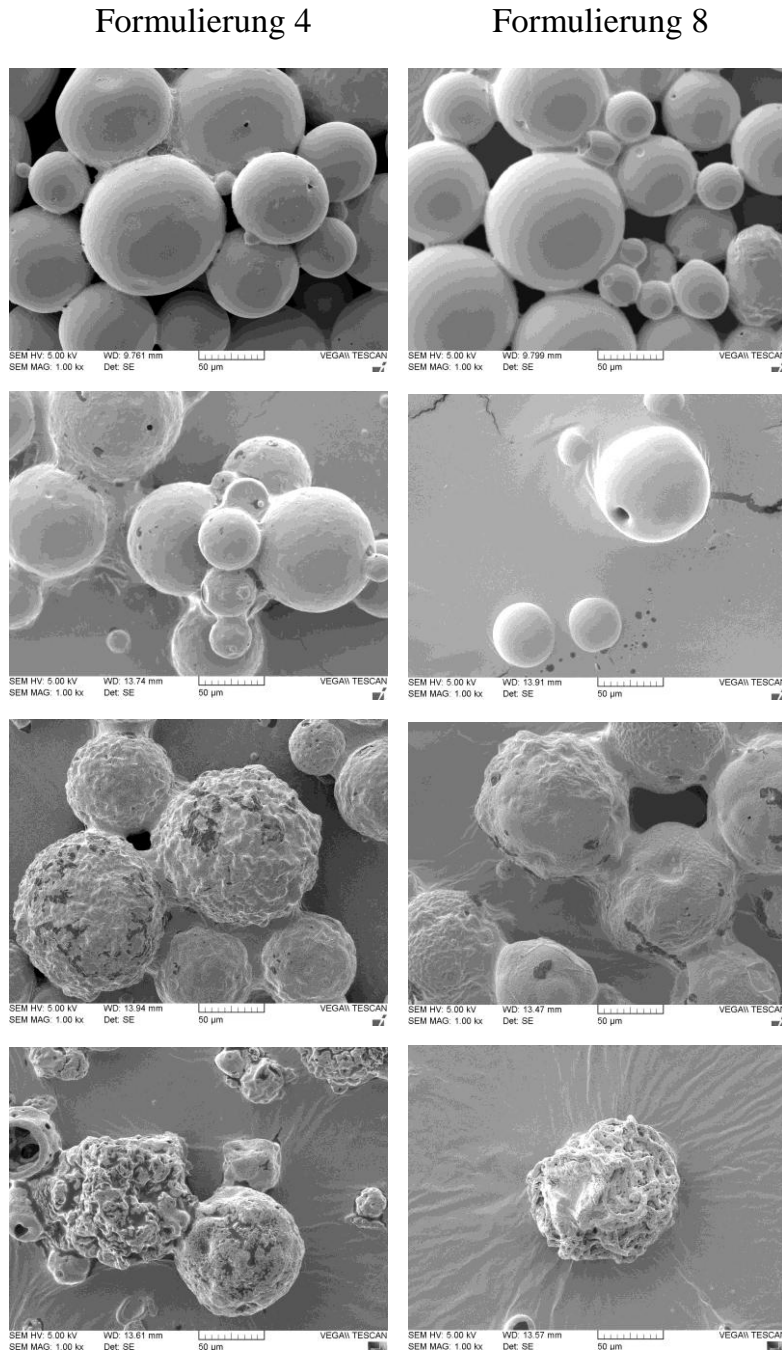


Abb. 4.4: REM-Aufnahmen von Mikropartikeln während der in-vitro Freisetzung (von oben nach unten: Start, 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen)

Mikropartikel, die PEG enthielten, schienen zu Beginn der Inkubation schneller zu erodieren, zeigten jedoch nach vier Wochen den gleichen Erosionszustand wie



vergleichbare Monoblockpolymer-Formulierungen. Nicht nur die Anwesenheit von PEG auch die Menge an Polymer hatte einen Einfluss auf das Freisetzungsverhalten. Formulierungen 8, 10 und 11 bestanden aus dem gleichen Polymer (RG 504). Die langsamste Freisetzung wurde bei Formulierung 8 beobachtet. Die Kontroll-Formulierung 11 zeigte die schnellste Freisetzung von BSA von allen drei Formulierungen. Grund dafür könnte die Schichtdicke der Polymermatrix gewesen sein. Formulierung 8 enthielt die größte Menge an Polymer, so dass das Protein von mehr Polymer umschlossen wurde als bei Formulierung 11. Das Freisetzungsmittel benötigte mehr Zeit um in die Partikel einzudringen. Ebenso war die Diffusionsstrecke des Proteins durch die Partikel verlängert. Das gleiche Phänomen wurde ebenfalls bei Formulierungen basierend auf RG 505 beobachtet. Alle Formulierungen außer F3 und die PEG-Formulierungen mit einer hohen initialen Freisetzung (F1, F5, F7) zeigten ein Plateau über sechs Wochen beginnend ab dem siebten (RG 504) oder dem vierzehnten Tag (RG 505). Wahrscheinlich wurde das Protein während der lag-Phase an der sich abbauenden Polymeroberfläche adsorbiert und erst später wieder desorbiert. Eine weitere Erklärung wäre auch, dass der Degradationszustand des Polymers und die dadurch entstandenen Poren zur Zeit der lag-Phase nicht groß genug waren, um das im Inneren der Partikel verkapselte Protein freizulassen. Die Erosion der Monoblockpolymere basierte anfangs auf Reduktion des Molekulargewichts. Erst zu einem späteren Zeitpunkt setzte zusätzlich Massenerosion ein [Dunne et al., 2000]. Die Formulierungen basierend auf RG 505, Formulierung 4 und die Triblockcopolymer-Formulierung (F3) zeigten eine unvollständige Freisetzung von BSA. Dies war vermutlich durch die Modifikation des Proteins durch chemische Zersetzungsreaktionen wie Deamidierung [Ibrahim et al., 2005] oder Acylierung [Lucke et al., 2002] bedingt. Denkbar wäre auch, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Polymer und Protein die Freisetzung unmöglich machten [Blanco et al., 1998]. Die Formulierungen auf Basis von RG 504 setzten das Protein komplett frei (F11) oder zeigten die Tendenz, das Protein zu einem späteren Zeitpunkt freizusetzen (F8, F10).

Das Freisetzungsprofil der Triblockcopolymer-Formulierung (F3) zeigte einen deutlich anderen Verlauf als die übrigen Mikropartikel-Formulierungen. Die Freisetzung von BSA erfolgte langsam und kontinuierlich über einen Zeitraum von neun Wochen ohne initiale Freisetzung und ohne lag Phase. Innerhalb der ersten zwei Wochen der Inkubation wurde eine Aufquellung der Partikel auf 139% der ursprünglichen Größe beobachtet. Ein Quellvorgang wurde auch bei allen anderen Mikropartikel-Formulierungen erfasst, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei Formulierung 3 (Abb. 4.5). Eine andere Studie präsentierte, dass Triblockcopolymere eine hydrogel-artige Struktur über den gesamten Partikel ausbildeten. Das Protein wurde über Diffusion durch die gequollene Matrix freigesetzt [Youxin et al., 1993].

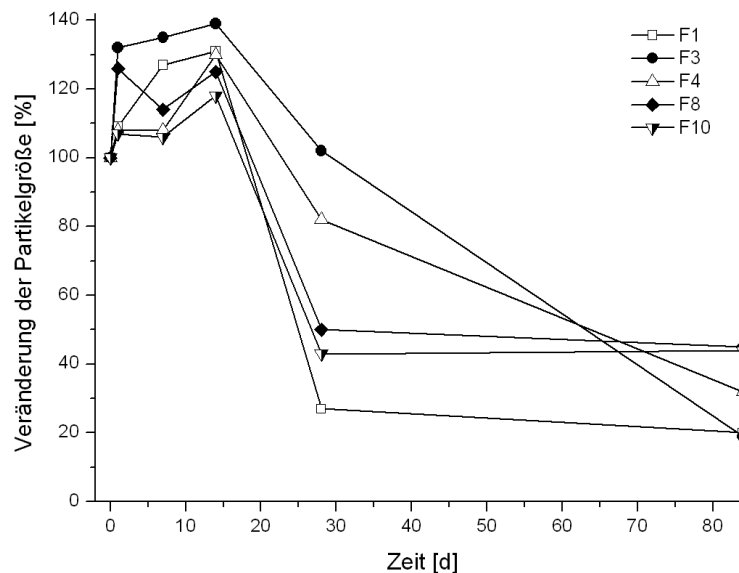
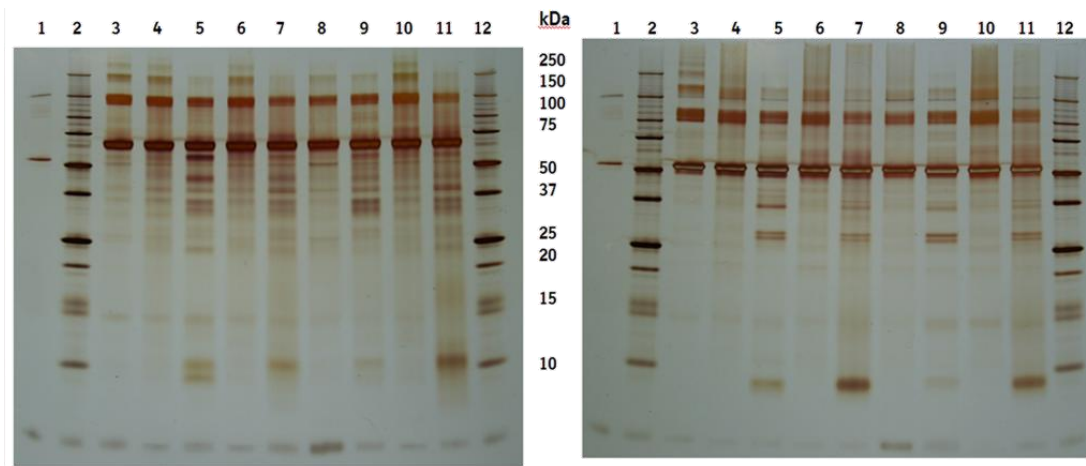


Abb. 4.5: Veränderung der Partikelgröße ausgewählter Mikropartikel-Formulierungen während der Freisetzung

Die Bestimmung der Proteinintegrität erfolgte von Freisetzungspunkten, die zwei und zwölf Wochen inkubiert wurden. Zum Vergleich wurde eine frisch hergestellte Proteinlösung aufgetragen.



- |                                      |                                |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| 1. BSA-Kontrolle 5 ng                | 7. Formulierung 1 (12 Wochen)  |
| 2. Molekulargewichtsmarker           | 8. Formulierung 3 (2 Wochen)   |
| 3. BSA-Standard (frisch hergestellt) | 9. Formulierung 3 (12 Wochen)  |
| 4. Formulierung 8 (2 Wochen)         | 10. Formulierung 4 (2 Wochen)  |
| 5. Formulierung 8 (12 Wochen)        | 11. Formulierung 4 (12 Wochen) |
| 6. Formulierung 1 (2 Wochen)         | 12. Molekulargewichtsmarker    |

Abb. 4.6: Proteinintegrität ausgewählter Freisetzungspuren mittels SDS-PAGE (links: reduziert; rechts: nicht reduziert)

Im nicht-reduzierten Gel trat bei allen Freisetzungspuren im Vergleich zur frisch hergestellten BSA-Lösung bei 20 kDa eine Zusatzbande auf, die sich in ihrer Intensität nicht änderte. Möglicherweise war dieses Fragment durch den Herstellprozess entstanden. Bei allen 12-Wochen-Freisetzungspuren wurden zwei zusätzliche Banden bei 50 kDa und bei 10 kDa detektiert (Abb. 4.6). Ursache dafür war vermutlich der pH-Wert-Abfall. Innerhalb von zwölf Wochen sank der pH-Wert von 7,4 auf 4,8. Durch die Polymerzersetzung bildete sich im Inneren der Partikel ein saures Mikroklima [Liu et al., 2012], das zur Proteinfragmentierung führen konnte. Es wurde angenommen, dass durch die Anwesenheit von Polyethylenglykol die entstandenen Säuren besser aus dem System ausgeschleust wurden [Mäder et al., 1998]. Der protektive Einfluss von PEG auf das Protein wurde in der SDS-PAGE ebenso wenig beobachtet wie eine Beeinflussung des verwendeten Polymertyps auf die Proteinintegrität.

Das Fazit dieser Untersuchungen war, dass die Herstellung von BSA-beladenen Mikropartikeln unter gleichen Bedingungen auf Basis verschiedener, kommerziell erhältlicher PLGA- oder PLGA-PEG-Kompositionen erfolgreich war. Es wurden Unterschiede in der Partikelgröße, der Morphologie und der spezifischen Oberfläche der verschiedenen Formulierungen beobachtet. Die Zugabe von Polyethylenglykol zur organischen Phase während des Herstellprozesses verbesserte die Proteinverteilung innerhalb der Partikel. Die in-vitro Freisetzung von BSA aus Mikropartikeln basierend auf physikalischen Mischungen oder Diblockcopolymeren war durch eine hohe initiale Freisetzung gekennzeichnet. Der generelle Freisetzungsverlauf dieser Formulierungen war vergleichbar mit dem der Monoblockpolymere. Die Freisetzung von BSA aus der Triblockcopolymer-Formulierung verlief langsam und kontinuierlich. Dieses Resomer® eignete sich wahrscheinlich sehr für eine Darreichungsform für Proteine mit verzögerter Freisetzung und wurde daher in weitere Studien eingebunden.

## 4.2 Optimierung des Herstellungsprozesses

Die innere Morphologie der Mikropartikel, die für das Polymerscreening hergestellt wurden, war gekennzeichnet durch relativ große Poren mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$ . Diese entstanden während der Herstellung der Primäremulsion unter Anwendung eines Ultraturrax. In einer anderen Studie wurde der Einfluss verschiedener Homogenisatoren auf die Herstellung der Primäremulsion untersucht. Es wurde gezeigt, dass durch Ultraschall kleinere Emulsionstropfen entstanden und dass das Protein tiefer in die Partikel eindrang als bei der Homogenisation durch einen Ultraturrax. Dadurch, dass das Protein tiefer in der Polymermatrix verankert wurde, wurde die initiale Freisetzung bei Mikropartikeln, die mit Ultraschall hergestellt wurden, sehr stark reduziert. Dieser Effekt wurde am Monoblockpolymer Resomer® RG 502 H untersucht [Wischke et al., 2005]. Ein kritisch zu betrachtender Parameter war die Partikelgröße. Im Polymerscreening waren die Mikropartikel durchschnittlich 98  $\mu\text{m}$  ( $D_{90}$  war im Schnitt 138  $\mu\text{m}$ ) groß. Für s.c. Injektionen werden in der Regel 25 bis 27 G Kanülen verwendet [Miller et al., 2010]. Da eine 27 G Nadel einen ungefähren Innendurchmesser von 216  $\mu\text{m}$  hat [Reiche, 2010], sollte der  $D_{90}$  der Partikel kleiner sein als der Innendurchmesser der Kanüle, um ein Verstopfen der Kanüle zu verhindern. In einer Versuchsreihe wurden, neben der Herstellung der Primäremulsion mittels Ultraschall, verschiedene Prozessparameter verändert (siehe Tab. 4.4) und der Einfluss dieser auf die Partikeleigenschaften und die Proteinfreisetzung untersucht. Als Modellprotein wurde BSA verwendet. Alle Formulierungen basierten auf Resomer® RGP t 50106 und waren mit 6% BSA beladen.

Tab. 4.4: Prozessparameter der einzelnen Mikropartikel-Formulierungen

Formu- lierung	Homogenisier- parameter W1/O	Äußere Phase W2	Rührgeschwindigkeit W1/O/W2	Gewinnung der Mikropartikel
<b>H1</b>	Ultraturrax	0,6%	FR: 1000 rpm; 60 min	Filtration
	7200 rpm; 30 s	PVA	MR: 300 rpm; 1 h	
<b>H2</b>	Ultraturrax	0,6%	FR: 1000 rpm; 60 min	Zentrifugation
	7200 rpm; 30 s	PVA	MR: 300 rpm; 1 h	
<b>H3</b>	Ultraturrax	0,6%	FR: 1000 rpm; 15 min	Filtration
	7200 rpm; 30 s	PVA	MR: 300 rpm; 2 h	
<b>H4</b>	Ultraschall	0,6%	FR: 1000 rpm; 60 min	Filtration
	60 W (~30%)	PVA	MR: 300 rpm; 1h	
<b>H5</b>	Ultraschall	6% PVA	FR: 1000 rpm; 15 min	Zentrifugation
	60 W (~30%)		MR: 300 rpm; 2 h	

Formulierung H1 wurde unter den ursprünglichen Prozessparametern wie im Polymerscreening hergestellt und diente in dieser Versuchsreihe als Referenz. Bei Formulierung H2 wurde untersucht, ob die Gewinnung der Mikropartikel durch Zentrifugation einen Einfluss hat. Mit Verkürzung der Rührdauer mit dem Flügelrührer von einer Stunde auf fünfzehn Minuten wurde Formulierung H3 hergestellt. Der Einfluss von Ultraschall wurde an Formulierung H4 demonstriert und in Formulierung H5 wurde die Konzentration der äußeren Phase verändert und alle in dieser Studie geänderten Prozessparameter eingebracht. In Tab. 4.5 wurden die Analysenergebnisse der einzelnen Formulierungen zusammengefasst. Der mittlere, volumenbezogene Partikeldurchmesser der Formulierungen H1 bis H4 betrug durchschnittlich  $119 \pm 10 \mu\text{m}$ . Die veränderten Prozessparameter wie Ultraschall oder Rührdauer hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Partikelgröße. Formulierung H5 wies die geringste Partikelgröße von allen Formulierungen mit  $40 \pm 5 \mu\text{m}$  auf. Die Konzentration der äußeren Phase hatte einen sehr großen Einfluss auf die Partikelgröße. PVA stabilisierte die nativen Mikropartikel, in dem es die Koaleszenz der Emulsionstropfen verhinderte. Durch Erhö-

hung der Konzentration lagerten sich mehr PVA-Moleküle in die Grenzfläche zwischen organischer Phase und äußerer Phase ein. Zwangsläufig führte das zu einer geringeren Größe der Tropfen und folglich zu einer geringeren Größe der Mikropartikel [Jeffery et al., 1991; Lamprecht et al., 2000b].

Die Verkapselungsrate lag durchschnittlich bei  $78 \pm 5\%$  und wurde durch die verschiedenen Prozessparameter im Wesentlichen nicht beeinflusst.

Tab. 4.5: Analysenergebnisse

Formulierung	Partikelgröße		Verkapselungsrate [%]
	VMD [ $\mu\text{m}$ ]	Spannweite	
<b>H1</b>	$115 \pm 2$	0,80	$73 \pm 4$
<b>H2</b>	$127 \pm 6$	0,73	$77 \pm 9$
<b>H3</b>	$107 \pm 6$	0,68	$75 \pm 3$
<b>H4</b>	$126 \pm 2$	0,68	$79 \pm 4$
<b>H5</b>	$40 \pm 5$	0,95	$85 \pm 5$

Auf den REM-Übersichtsaufnahmen war erkennbar, dass die Mikropartikel aller Formulierungen sphärisch waren, jedoch in ihrer Größe und Größenverteilung variierten (Abb. 6.1). Die Detailaufnahmen in Abb. 4.7 zeigten, dass die Oberflächen der Partikel eine leichte Porosität aufwiesen, die durch das verwendete Triblockcopolymer bedingt und bereits bei Formulierung F3 des Polymerscreenings zu beobachten waren. In Abb. 4.8 zeigte sich, dass die Behandlung der Primäremulsion mit Ultraschall zu einer deutlich feineren, inneren Porosität führte als die Anwendung von Ultraturrax.

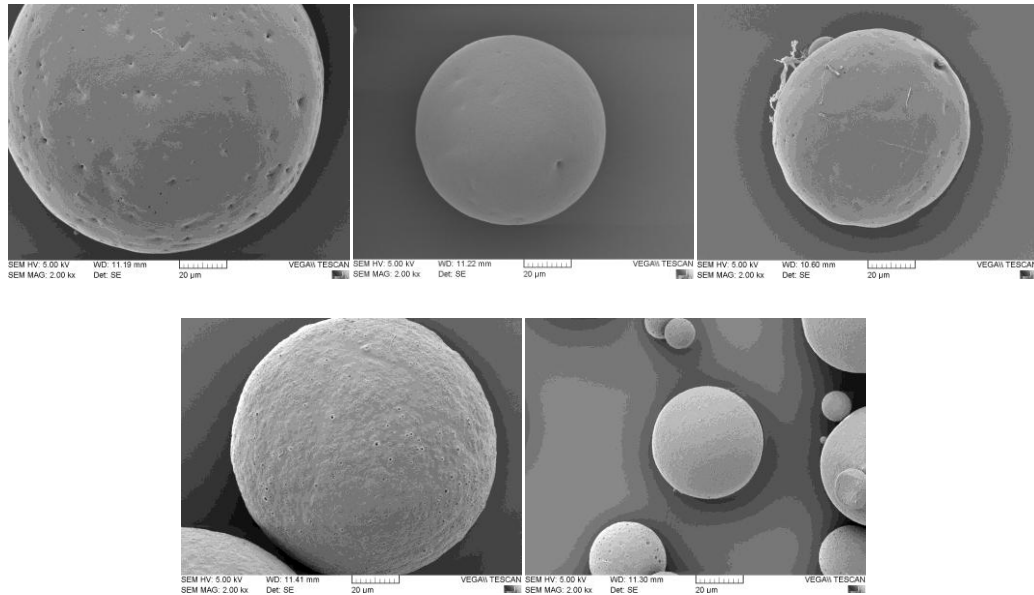


Abb. 4.7: REM-Aufnahmen der verschiedenen Mikropartikelformulierungen in 200-facher und 2000-facher Vergrößerung (H1, H2, H3, H4, H5 v.l.n.r.)

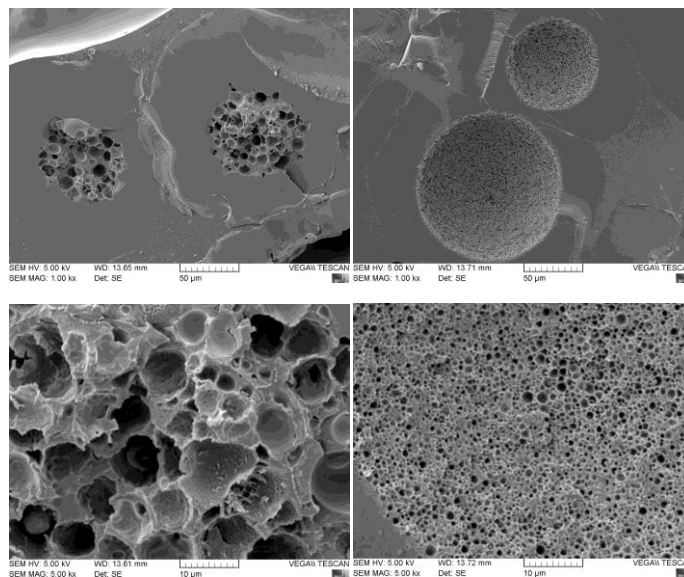


Abb. 4.8: REM-Aufnahmen der Mikropartikel-Querschnitte von H1 und H4

Die in-vitro Freisetzung der verschiedenen Mikropartikel-Formulierungen wurde in Abb. 4.9 dargestellt. Der Freisetzungspuffer II war höher konzentriert als der Freisetzungspuffer I, der für das Polymerscreening angewendet wurde. Das hatte zur Konsequenz, dass Formulierung H1 ein anderes Freisetzungsverhalten zeigte, als Formulierung F3 des Polymerscreenings, obwohl es sich um die gleiche For-



mulierungszusammensetzung handelte. Die höhere Konzentration bedingte eine höhere Osmolalität des Freisetzungsmediums. Die Wasseraufnahme des Systems sank. Dadurch wurde die Wirkstoffmobilität eingeschränkt und letztlich die Freisetzung des Wirkstoffs verlangsamt [Faisant et al., 2006]. Zusätzlich wurde durch den höher molaren Freisetzungspuffer II die Absenkung des pH-Werts durch Degradation des Polymers verhindert. Nach 12 Wochen Inkubation lag der pH-Wert der Freisetzungproben bei 7,1, wohingegen die Freisetzungproben des Polymerscreenings nach gleicher Inkubationszeit einen pH-Wert von 4,8 aufwiesen.

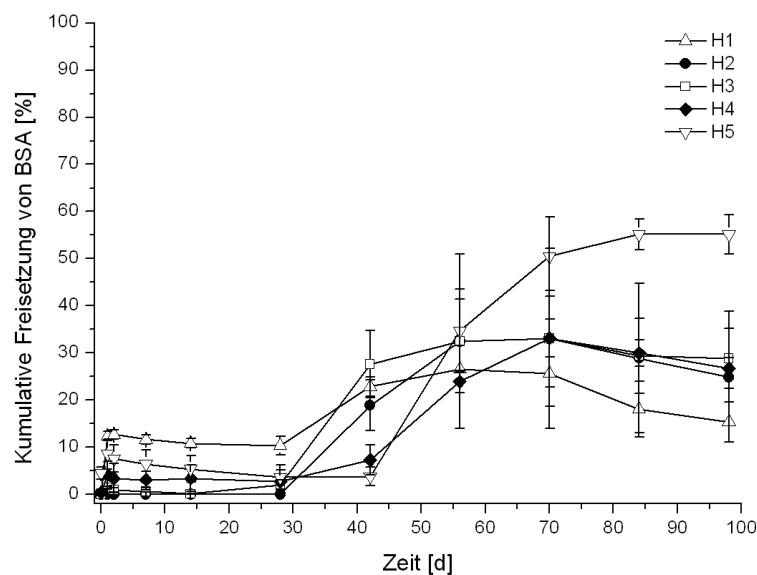


Abb. 4.9: In-vitro Freisetzung der Mikropartikel mit veränderten Prozessparametern

Formulierung H1 zeigte die höchste initiale Freisetzung mit 15% gefolgt von einer lag-Phase. Nach vier Wochen Inkubation setzte eine langsame und kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffs ein. Die Anwendung der Zentrifugation (H2) zur Gewinnung und Reinigung der Mikropartikel sowie die Verringerung der Rührdauer mittels Flügelrührer (H3) führten zu einer leichten Veränderung des initial burst, der Freisetzungsverlauf war jedoch unverändert im Vergleich zu H1. Der Einsatz von Ultraschall in Formulierung H4 und H5 führte zu minimalen Veränderungen im initial burst, verzögerte jedoch die spätere Freisetzung, den sogenannten late burst, um zwei Wochen gegenüber der Referenz. Anschließend

setzte eine kontinuierliche Freisetzung des BSA ein. Normalerweise setzten kleinere Partikel den Wirkstoff schneller frei als größere, da sie eine kleine Oberfläche besaßen und durch das Freisetzungsmedium besser benetzt wurden. Die Partikel der Formulierung H5 waren dreimal kleiner als die Partikel der Formulierung H1 und setzten dennoch BSA langsamer frei. Die höhere PVA-Konzentration erschwerte die Diffusion des Proteins aus den Partikeln [Yang et al., 2001] und führte zu einer verzögerten Freisetzung.

Durch Veränderung verschiedener Parameter wurde der Prozess zur Produktion von Mikropartikeln mit dem Lösungsmittelverdampfungs-Verfahren optimiert. Zur Herstellung der Primäremulsion eignete sich Ultraschall und wurde gegenüber der Anwendung des Ultraturrax bevorzugt, da die Mikropartikel in der Freisetzung einen geringen initialen burst zeigten und mehr Wirkstoff freisetzten. Die Verkürzung der Rühdauer des Flügelrührers hatte keine Auswirkungen auf die Partikeleigenschaften, steigerte allerdings die Anzahl hergestellter Chargen pro Tag. Gegenüber der Filtration war die Zentrifugation aufwendiger in der Bedienung, zeichnete sich jedoch durch größere Anwendungsmöglichkeiten (z.B. Partikelgewinnung aus höher viskosen, äußeren Phasen) und durch ansehnliche Beschaffenheit der Lyophilisate aus.

### **4.3 Änderung des Stabilisators der äußeren Phase**

Polyvinylalkohol ist ein synthetisches Polymer, das in der pharmazeutischen Industrie häufig in Ophthalmika zur Viskositätserhöhung und in Tabletten zur verzögerten Wirkstofffreisetzung eingesetzt wird. Es hat sich außerdem in der Herstellung von PLGA-Mikropartikeln durchgesetzt und wird dort standardmäßig als Stabilisator der äußeren Phase eingesetzt. Das Polymer gilt als unbedenklich. Dennoch ist zu beachten, dass bei der Mikropartikelherstellung ein nicht unerheblicher Teil des Stabilisators an den Partikeln haften bleibt und letztendlich mit in den Körper gelangt. An Ratten wurde gezeigt, dass sich die subkutane Applikation einer 5%igen, wässrigen PVA-Lösung in Organen und Geweben verteilte und zu Anämie führte [HALL et al., 1963]. Lück fand heraus, dass die Anwesenheit von PVA die Adsorption von Plasmaproteinen an Mikropartikeln steigerte [Lück et al., 1998]. Das kann zur Folge haben, dass die Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln beeinflusst wird. Trotz der möglichen in-vivo Komplikationen gibt es wenig Studien, die sich mit der Suche nach alternativen Stabilisatoren für die äußere Phase in der Mikroverkapselung beschäftigen.

#### **4.3.1 Identifizierung eines Stabilisators für die äußere Phase**

Die Herstellung von PLGA-Mikropartikeln mit PVA als Stabilisator in der äußeren Phase war erfolgreich. In einer kleinen Studie wurden Mikropartikel hergestellt, bei denen verschiedene Substanzen als Stabilisator in der äußeren Phase eingesetzt wurden. Als Polymer wurde das Monoblockpolymer Resomer® RG 504 eingesetzt. Alle Formulierungen wurden mit 17,5% BSA beladen. Die Herstellung der Partikel erfolgte unter gleichen Bedingungen nach der ursprünglichen Methode. Die Primäremulsion wurde mit dem Ultraturrax hergestellt. Die Doppelemulsion wurde für eine Stunde mit dem Flügelrührer gerührt, und die Partikel wurden über Filtration gewonnen. Anhand von Vorversuchen (nicht dargestellt) wurde die Konzentration der jeweiligen äußeren Phase näherungsweise evaluiert. Maßgebend war hierbei eine geringe Viskosität, so dass die Mikropartikel-Suspension filtrierbar war (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Zusammensetzung der Formulierungen

Formu- lierung	Polymer	Äußere Phase		
		Substanz	Konzentration [%]	Viskosität [mPas]
<b>A1</b>	RG 504	PVA	0,6	1,312
<b>A2</b>	RG 504	Polysorbat 20	0,24	1,056
<b>A3</b>	RG 504	Methylcellulose 4000	0,05	1,873
<b>A4</b>	RG 504	CMC-Na	0,2	2,293
<b>A5</b>	RG 504	Na-Desoxycholat	1	1,034

In Tab. 4.7 wurden die Analysenergebnisse der Formulierungen dargestellt. Die Partikel aller Formulierungen waren sehr groß. Die Referenz A1 hatte einen mittleren, volumenbezogenen Partikeldurchmesser von 85  $\mu\text{m}$  und war somit die Formulierung mit den kleinsten Partikeln. Formulierung A5 hatte einen VMD von 129  $\mu\text{m}$ , alle anderen Formulierungen hatten eine durchschnittliche Partikelgröße von mehr als 200  $\mu\text{m}$ . Die Verkapselungsrate lag im Mittel bei 59%, wobei Formulierung A3 die höchste Verkapselungsrate von 65% erreichte. Zu beachten war bei diesen Ergebnissen, dass die theoretische Beladung der Partikel mit Protein mehr als doppelt so hoch war wie in den bisherigen Experimenten. Im Vergleich von Formulierung F8 (Polymerscreening) mit Formulierung A1 blieb die Partikelgröße konstant, jedoch wurde die Verkapselungsrate durch die höhere Beladung an BSA gesenkt. Auch wenn die Verkapselungsrate bei A1 geringer war, beinhaltete diese Formulierung effektiv mehr Protein als F8, nämlich 9,6%. Bei Formulierung F8 waren es effektiv nur 5,5% BSA. Allerdings war der Wirkstoffverlust bei A1 mit 45% sehr viel höher als bei F8 mit nur 17%. Bei der Verwendung eines sehr teuren Wirkstoffs wie ein therapeutisches Protein ist dieser Aspekt nicht unerheblich.

Tab. 4.7: Analysenergebnisse

Formulierung	Partikelgröße		Verkapselungsrate [%]
	VMD [ $\mu\text{m}$ ]	Spannweite	
A1	$85 \pm 5$	$0,92 \pm 0,08$	$55 \pm 7$
A2	$262 \pm 10$	$0,75 \pm 0,06$	$60 \pm 2$
A3	$198 \pm 8$	$1,31 \pm 0,12$	$65 \pm 5$
A4	$263 \pm 6$	$0,76 \pm 0,04$	$52 \pm 4$
A5	$129 \pm 4$	$2,40 \pm 0,20$	$62 \pm 1$

Die in Abb. 4.10 dargestellte Grafik zeigt den Freisetzungverlauf aller Formulierungen, der durch einen hohen initial burst gekennzeichnet war. Formulierung A1 und Formulierung A3 setzten das Protein auf die gleiche Weise frei, obwohl zwischen den Partikeln ein erheblicher Partikelgrößenunterschied herrschte.

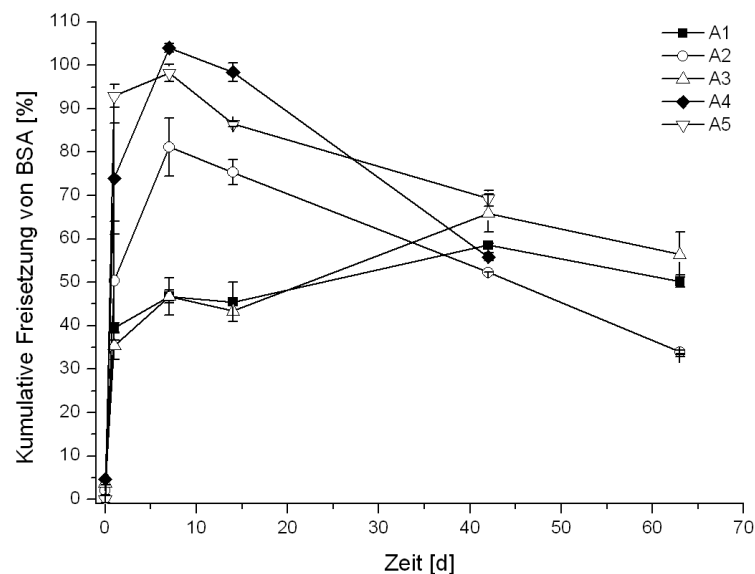


Abb. 4.10: In-vitro Freisetzung der Mikropartikel-Formulierungen

A2, A4 und A5 hatten bereits nach einer Woche über 80% des Wirkstoffs freigesetzt, was auf eine poröse Oberflächenstruktur dieser Formulierungen zurückzuführen ist (Abb. 4.11). Polysorbat 20 und Natrium-Desoxycholat haben im Vergleich zu den anderen verwendeten Substanzen ein geringes Molekulargewicht. Aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften und der kleinen Größe konnten

sie sich in die Grenzfläche zwischen organischer und äußerer Phase einlagern und somit zu einer schnellen Benetzung der Partikel während der Freisetzung führen.

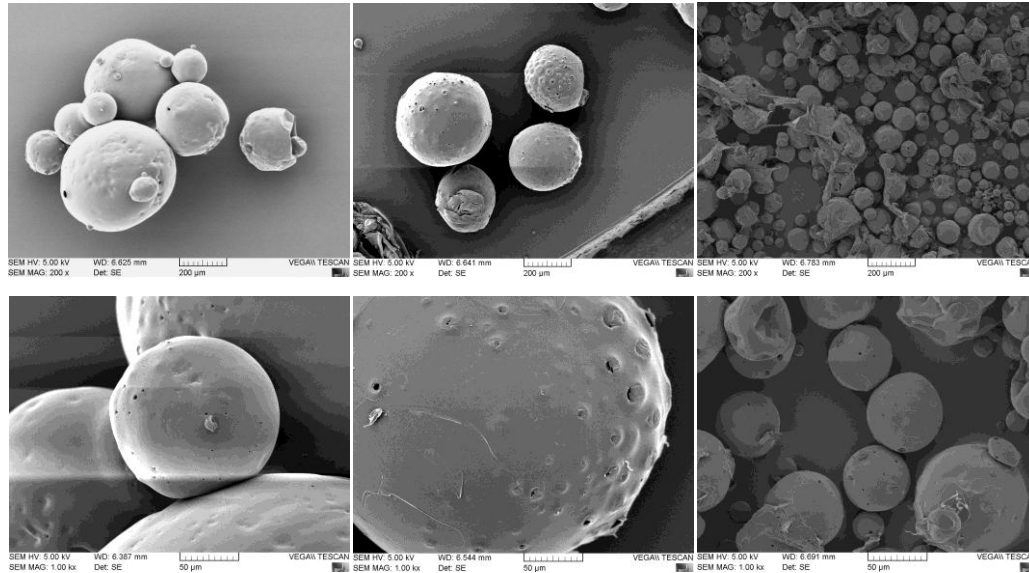


Abb. 4.11: Repräsentative REM-Aufnahmen der Formulierungen A2, A4, A5 (v.l.n.r.)

Es ließen sich mit allen verwendeten Substanzen, die als Stabilisator in der äußeren Phase eingesetzt wurden, Mikropartikel herstellen. Im Wesentlichen wurden die Partikelgröße und die in-vitro-Freisetzung durch die wechselnde äußere Phase beeinflusst. Alle Formulierungen brachten Partikel hervor, die durchschnittlich 200  $\mu\text{m}$  groß und somit zu groß für die subkutane Applikation waren. Durch Erhöhung der Rührgeschwindigkeit ließe sich die Partikelgröße regulieren, so dass die Fertigung von kleineren Partikeln möglich wäre. Auch durch eine Konzentrationsänderung des Stabilisators kann die Partikelgröße reduziert werden. Abgesehen von der Freisetzungsrates war das Freisetzungsprofil der Formulierung A3, die mit Methylcellulose in der äußeren Phase hergestellt wurde, sehr vielversprechend. Alle weiteren Stabilisatoren wurden bereits in anderen Studien charakterisiert [Arica et al., 2005; Bodmeier et al., 1987; Perugini et al., 2002], so dass die Eignung von Methylcellulose als Stabilisator in der äußeren Phase in dieser Arbeit näher untersucht wurde.

### 4.3.2 Statistische Versuchsplanung

Methylcellulose ist ein halbsynthetisches Makromolekül, das aus Cellulose durch Veresterung der Hydroxylgruppen hergestellt wird. Der Polymerisationsgrad und das Molekulargewicht sind sehr variabel. Mit steigendem Polymerisationsgrad erhöht sich das Molekulargewicht und die Viskosität der Lösung, da die Celluloseketten länger werden. Generell werden Methylcellulose Typen über die Viskosität einer zweiprozentigen, wässrigen Lösung bei 20 °C definiert. In der vorangegangenen Versuchsreihe wurde Methylcellulose 4000 mit einer Konzentration von 0,05% eingesetzt. Diese Lösung war gerade noch filtrierbar. Würden höhere Konzentrationen eingesetzt werden, um die Partikelgröße zu reduzieren, ist Filtration nicht mehr möglich. Ab einer bestimmten Viskosität ist auch die Partikelgewinnung durch Zentrifugation größerer Mengen problematisch, da keine ausreichende Sedimentation mehr stattfindet. In dieser Versuchsreihe wurde daher Methylcellulose 15 eingesetzt, die sich durch eine geringe Viskosität auszeichnet. Durch die kürzeren Celluloseketten ist die Grenzflächenaktivität höher, so dass die Emulsionströpfchen besser stabilisiert werden können. Um die optimalen Prozessparameter zur Herstellung von PLGA-Mikropartikeln mit MC 15 als Stabilisator zu finden, wurde eine statistische Versuchsplanung aufgestellt. Einflussgrößen waren die Stärke der Ultraschallbehandlung der Primäremulsion, die Rührgeschwindigkeit der Doppelemulsion, die insgesamt 15 min rührte, und die Konzentration der Methylcellulose. Die Mikropartikel bestanden aus dem Triblockcopolymer Resomer® RGP t 50106 und 6% BSA. Als Zielgrößen wurden die Ausbeute, die Partikelgrößenverteilung ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ) und die Verkapselungsrate einbezogen. Die in-vitro Freisetzung wurde zusätzlich untersucht. In Tab. 4.8 ist die Zusammensetzung der einzelnen Formulierungen aufgelistet. Jede Formulierung wurde einmal hergestellt. Formulierung N15 bis N17 bildeten den Mittelpunkt und gaben Auskunft auf die Reproduzierbarkeit des Prozesses.

Tab. 4.8:      Zusammensetzung der Formulierungen

	<b>Amplitude</b>	<b>Rührgeschwindigkeit</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Formulierung</b>	<b>Ultraschall</b>	<b>W2</b>	<b>MC</b>
	<b>[%]/[W]</b>	<b>[U/min]</b>	<b>[%]</b>
<b>N1</b>	10/20	500	0,5
<b>N2</b>	60/120	500	0,5
<b>N3</b>	10/20	1500	0,5
<b>N4</b>	60/120	1500	0,5
<b>N5</b>	10/20	500	5
<b>N6</b>	60/120	500	5
<b>N7</b>	10/20	1500	5
<b>N8</b>	60/120	1500	5
<b>N9</b>	10/20	1000	2,75
<b>N10</b>	60/120	1000	2,75
<b>N11</b>	35/70	500	2,75
<b>N12</b>	35/70	1500	2,75
<b>N13</b>	35/70	1000	0,5
<b>N14</b>	35/70	1000	5
<b>N15</b>	35/70	1000	2,75
<b>N16</b>	35/70	1000	2,75
<b>N17</b>	35/70	1000	2,75

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 4.9 dargestellt. Die statistische Auswertung mit dem Programm MODDE Version 7 ergab, dass die Ausbeute und die Partikelgrößenverteilung durch die Rührgeschwindigkeit und die MC-Konzentration der äußeren Phase beeinflusst wurden. Die Verkapselungsrate war dagegen nur von der MC-Konzentration abhängig. Die Stärke der Ultraschallbehandlung der Primäremulsion hatte keine Auswirkung auf die Zielgrößen. Langsames Rühren (500 U/min) führte zu größeren Partikeln als schnelles Rühren bei 1500 U/min. Bei gleichbleibender Ultraschallstärke und MC-Konzentration wurde die Partikelgröße durch schnelles Rühren um das Vierfache kleiner (Vergleich N11 mit



N12). Generell wurden durch den Einsatz der niedrigen MC-Konzentration grössere Partikel erhalten als bei der hohen MC-Konzentration. Durch eine hohe Rührgeschwindigkeit und eine hohe MC-Konzentration wurden, bezogen auf den VMD, sehr kleine Partikel erzielt, durchschnittlich 15 µm groß (N7, N8).

Die Verkapselungsrate war bei allen Formulierungen hoch. Dennoch wurden bei Formulierungen mit 0,5% MC und 2,75% MC durchschnittlich 90% des eingesetzten BSA verkapselt, wohingegen bei Formulierungen, die mit 5% MC in der äußeren Phase hergestellt wurden, die Verkapselungsrate bei 78% lag (N5 – N9, N14). Dieser Trend spiegelte sich auch in der Ausbeute wider. Formulierungen mit 5% MC zeigten die geringste Ausbeute mit durchschnittlich 58%. Die Ausbeute aller übrigen Formulierungen lag im Mittel bei 71%.

Tab. 4.9: Analysenergebnisse der Formulierungen aus der statistischen Versuchsplanung

Formulierung	Ausbeute [%]	Partikelgröße			Verkapselungsrate [%]
		D <sub>10</sub> [µm]	D <sub>50</sub> [µm]	D <sub>90</sub> [µm]	
N1	80	150	221	296	91
N2	76	147	233	318	95
N3	69	40	86	142	88
N4	72	40	85	135	90
N5	67	31	58	93	78
N6	64	27	52	81	73
N7	54	5	14	23	78
N8	50	7	18	33	80
N9	80	23	49	74	88
N10	71	32	58	82	88
N11	73	65	116	172	94
N12	69	12	30	50	74
N13	66	79	132	288	90
N14	54	11	33	55	79

Formulierung	Ausbeute [%]	Partikelgröße			Verkapselungsrate [%]
		D <sub>10</sub> [µm]	D <sub>50</sub> [µm]	D <sub>90</sub> [µm]	
<b>N15</b>	72	24	56	82	92
<b>N16</b>	68	24	54	79	91
<b>N17</b>	77	27	50	73	90

In Abb. 4.12 ist die in-vitro Freisetzung von BSA ausgewählter Formulierungen dargestellt, die alle ungefähr die gleiche Partikelgröße hatten. Die Freisetzung von BSA aus PLGA-Mikropartikeln war abhängig von der verwendeten MC-Konzentration. Partikel, die mit 0,5% MC hergestellt wurden, zeigten eine geringe initiale Freisetzung (N3, N4), wohingegen Partikel, die in 2,75% MC gefertigt wurden, einen burst von 30% erzielten (N9, N15 – N17). Mit 5% MC in der äußeren Phase resultierte eine initiale Freisetzung von 80%. Außerdem wurde eine Abhängigkeit der Freisetzung von der in die Primäremulsion eingebrachte Ultraschallstärke beobachtet. Besonders deutlich wurde es bei Partikeln, die aus 2,75% MC hergestellt wurden. Formulierung N9 wurde mit einer niedrigen Ultraschallamplitude hergestellt und zeigte einen initial burst von 30%. Formulierung N10 wurde mit der höchsten Ultraschallamplitude angefertigt und zeigte eine hohe, initiale Freisetzung von 80%. Die innere Morphologie beider Formulierungen wies hingegen keine Unterschiede in Porenstruktur und Porengröße auf (Abb. 6.4). In anderen Studien wurden bereits Mikropartikel mit Methylcellulose als äußerer Phase hergestellt. Es wurden MC 400 und MC 10 eingesetzt. Die Partikel wurden hinsichtlich Morphologie, Größe und Verkapselungsrate untersucht. Es wurden zusätzlich Mischungen von PVA und MC in der äußeren Phase bei der Herstellung dieser Mikropartikel angewendet. Nur diese Mikropartikel wurden in-vitro freigesetzt und zeigten das gewünschte Freisetzungsverhalten. Der Einfluss von MC auf die in-vitro Freisetzung wurde im Einzelnen nicht untersucht [Cavalier et al., 1986; Puthli et al., 2009a].

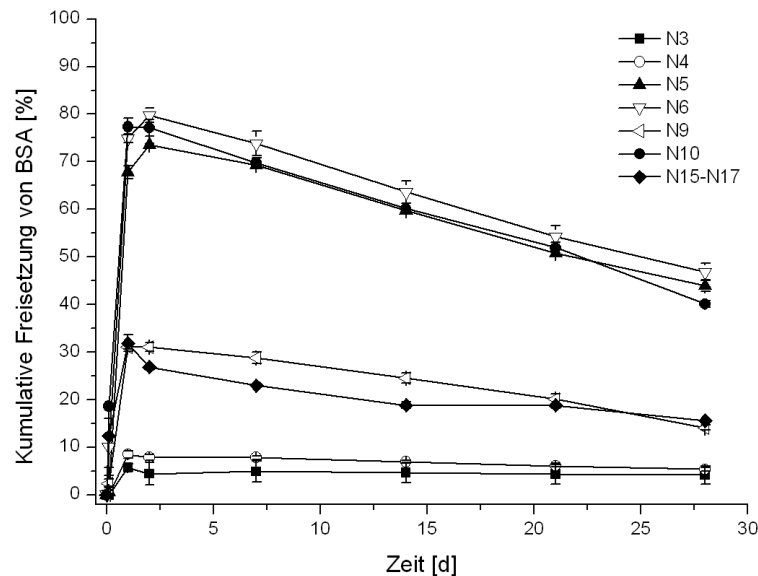


Abb. 4.12: In-vitro Freisetzung von BSA ausgewählter Formulierungen

Aus allen Rezepturen konnten Mikropartikel hergestellt werden. Die Mikropartikel der Formulierungen, die mit 0,5% Methylcellulose produziert wurden, waren im Vergleich sehr groß. Zwar zeichneten sie sich durch eine geringe initiale Freisetzung aus, jedoch waren die Partikel bei einer Rührgeschwindigkeit von 1500 U/min durchschnittlich 85  $\mu\text{m}$  groß. Mit 5% Methylcellulose in der äußeren Phase ließen sich hingegen sehr kleine Partikel herstellen. Nachteilig war indes die geringe Ausbeute und Verkapselungsrate sowie die hohe initiale Freisetzung. Auf Basis von 2,75% Methylcellulose ließen sich Mikropartikel anfertigen, die sich durch eine hohe Verkapselungsrate und eine geeignete Partikelgrößenverteilung auszeichneten. Der  $D_{90}$  war kleiner als 100  $\mu\text{m}$  und der mittlere, volumenbezogene Durchmesser betrug 53  $\mu\text{m}$ . Die Freisetzung zeigte einen initial burst von 30% bei moderater Ultraschallbehandlung der Primäremulsion. Auf Grundlage dieser Formulierung (N15 – N17) wurden weitere Experimente durchgeführt, um die optimale Formulierung zu entwickeln. Grundsätzlich kann durch die Wahl und die Konzentration der äußeren Phase die Freisetzung gesteuert werden.

### 4.3.3 Etablierung von Methylcellulose als äußere Phase

Mit 2,75% Methylcellulose 15 in der äußeren Phase und einer Rührgeschwindigkeit von 1000 U/min lassen sich Mikropartikel mit guter Verkapselungsrate und angemessener Partikelgröße herstellen. Die in-vitro Freisetzung des Proteins zeigte jedoch einen initial burst gefolgt von einer Verzögerungsphase, in der kein Protein freigesetzt wurde. Da eine langsame, aber kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffs angestrebt wird, ist das Freisetzungsprofil durch den Zusatz von Hilfstoffen zu modifizieren. In einer Studie haben Jiang et al. herausgefunden, dass durch die Erhöhung der Osmolalität der äußeren Phase mit Natriumchlorid oder Saccharose, der initial burst gesenkt werden konnte. Durch die erhöhte Osmolalität floss Wasser von der inneren Phase nach außen, so dass weniger Wasser im Inneren der Partikel verblieb und somit zu einer weniger porösen, inneren Partikelstruktur führte als Partikel, die ohne Zusatz in der äußeren Phase hergestellt wurden, resultierend in einer geringen initialen Freisetzung von BSA. Die Proteinintegrität wurde durch die Zusätze nicht beeinflusst [Jiang et al., 2002]. Empfindlichere Proteine als BSA können durch die Anwesenheit von Natriumchlorid geschädigt werden, so dass sich die Anwendung von Zuckern oder Zuckeralkoholen anbietet. Sorbitol hat sich neben anderen Substanzen als Stabilisator für Proteinformulierungen etabliert [Jorgensen et al., 2009]. In einer Versuchsreihe wurde daher der Einfluss verschiedener Sorbitolkonzentrationen in der äußeren Phase auf die Partikeleigenschaften und auf die in-vitro Freisetzung untersucht. Es wurden Mikropartikel auf Basis von Resomer® RGP t 50106 hergestellt, die entweder 5% Antikörper oder 6% Lysozym enthielten. Alle Formulierungen wurden 15 min mit dem Flügelrührer bei 1000 U/min behandelt und anschließend auf dem Magnetrührer für 18 h gerührt. Um den Effekt der längeren Rührzeit zu untersuchen, wurden ausgewählte Formulierungen erneut hergestellt, indem sie nur zwei bis fünf Stunden auf dem Magnetrührer waren. In Tab. 4.10 sind alle Formulierungen aufgelistet. Die Formulierungen, die nicht über 18 h auf dem Magnetrührer rührten, sind mit ‚k‘ gekennzeichnet. Von jeder Formulierung wurden insgesamt drei Chargen hergestellt.

Tab. 4.10: Zusammensetzung der Formulierungen und Analysenergebnisse

Formu- lierung	Protein	Sorbitol- anteil [%]	Osmolalität W2 [mosmol/kg]	VMD [ $\mu\text{m}$ ]	Verkapselungs- rate [%]
<b>LS-0</b>	Lysozym	0	15	$53 \pm 9$	$39 \pm 8$
<b>LS-1k</b>	Lysozym	1	65	$53 \pm 7$	$53 \pm 9$
<b>LS-2k</b>	Lysozym	2	132	$52 \pm 4$	$56 \pm 4$
<b>LS-4</b>	Lysozym	4	282	$53 \pm 3$	$61 \pm 6$
<b>LS-4k</b>	Lysozym	4	282	$52 \pm 5$	$85 \pm 3$
<b>LS-8</b>	Lysozym	8	495	$43 \pm 5$	$64 \pm 5$
<b>LS-12</b>	Lysozym	12	772	$48 \pm 8$	$66 \pm 6$
<b>LS-16</b>	Lysozym	16	1100	$53 \pm 6$	$61 \pm 6$
<b>LS-20</b>	Lysozym	20	1349	$55 \pm 2$	$67 \pm 4$
<b>LS-20k</b>	Lysozym	20	1349	$54 \pm 6$	$70 \pm 2$
<b>AS-0</b>	Antikörper	0	15	$67 \pm 8$	$83 \pm 8$
<b>AS-1</b>	Antikörper	1	65	$70 \pm 9$	$60 \pm 6$
<b>AS-2</b>	Antikörper	2	132	$79 \pm 7$	$63 \pm 3$
<b>AS-4</b>	Antikörper	4	282	$74 \pm 3$	$102 \pm 4$
<b>AS-8</b>	Antikörper	8	495	$73 \pm 2$	$96 \pm 6$
<b>AS-12</b>	Antikörper	12	772	$80 \pm 5$	$98 \pm 5$
<b>AS-16</b>	Antikörper	16	1100	$66 \pm 3$	$99 \pm 4$
<b>AS-16k</b>	Antikörper	16	1100	$68 \pm 6$	$106 \pm 4$
<b>AS-20</b>	Antikörper	20	1349	$75 \pm 5$	$100 \pm 4$

Die Partikelgröße aller Formulierungen wurde weder durch unterschiedliche Rührzeiten noch durch Sorbitol in der äußeren Phase beeinflusst. Die Mikropartikel, die mit Lysozym beladen wurden, waren durchschnittlich  $52 \mu\text{m}$  groß und damit genau so groß wie die Mikropartikel, die mit BSA beladen waren (Formulierung N15 – N17). Die Mikropartikel, die den Antikörper enthielten, waren durchschnittlich  $72 \mu\text{m}$ .

Wie schon in einer anderen Studie gezeigt werden konnte, wurde durch den Zusatz von Sorbitol zu der äußeren Phase die Verkapselungsrate gesteigert [Freitag et al., 2000]. Ohne Sorbitol waren die Mikropartikel der Formulierung LS-0 mit 39% des eingesetzten Lysozyms beladen, wohingegen 4% Sorbitol die Verkapselungsrate auf 61% anstiegen ließ (LS-4). Bei den Antikörper-Formulierungen führte die Zugabe des Zuckeralkohols zur äußeren Phase ab einem Anteil von 4% zu einer vollständigen Verkapselung der eingesetzten Proteinmenge (AS-4). Die Osmolalität der äußeren Phase mit 4% Sorbitol betrug 282 mosmol/kg und war somit annähernd so groß wie die Osmolalität der Proteinlösungen (262 mosmol/kg Lysozym; 300 mosmol/kg Antikörper). Der osmotische Austausch zwischen innerer und äußerer Phase war nur minimal. Ab 8% Sorbitol in der äußeren Phase lag die Osmolalität über der Osmolalität der Proteinlösungen. Um einen Ausgleich zu schaffen, wanderte Wasser aus der inneren Phase nach außen, jedoch wurde die Teilchenanzahl nicht verändert, so dass das Protein im Inneren verblieb und nicht hinaus diffundierte. Die Verkapselungsrate stieg. Die Rührdauer hatte einen Einfluss auf die Verkapselungsrate der Formulierungen, bei denen die Osmolalität der äußeren Phase unter der Osmolalität der eingesetzten Proteinlösung lag. Bei kurzer Rührdauer waren bei LS-4k 85% Lysozym verkapselt, wohingegen bei Formulierung LS-4 mit langer Rührdauer nur 61% des Proteins verkapselt wurden. Bei 20% Sorbitol in der äußeren Phase hatte die Rührdauer keinen Einfluss. Die Verkapselungsrate von Lysozym war nahezu gleich (LS-20, LS-20k). Das gleiche Phänomen wurde bei den Antikörper-Formulierungen beobachtet. 16% Sorbitol hielt die eingesetzte Proteinmenge vollständig in den Mikropartikeln unabhängig von der Rührzeit (AS-16, AS-16k).

Die Länge der Rührzeit wirkte sich deutlich auf die In-vitro Freisetzung des verkapselten Proteins aus (Abb. 4.13). Langes Rühren führte bei Lysozym enthaltenen Mikropartikeln, die mit 4% Sorbitol hergestellt wurden, zu einem late burst nach fünf Wochen (LS-4). Durch eine kürzere Rührdauer verschob sich der late burst um eine Woche und fand erst nach sechs Wochen statt (LS-4k). Wahrscheinlich verursachte langes Rühren ein Aufquellen der Partikel aufgrund des Hydrogelcharakters des Triblockcopolymers und führte durch die anschließende

Trocknung zu einer porösen Struktur, durch die der frühere late burst bedingt wurde.

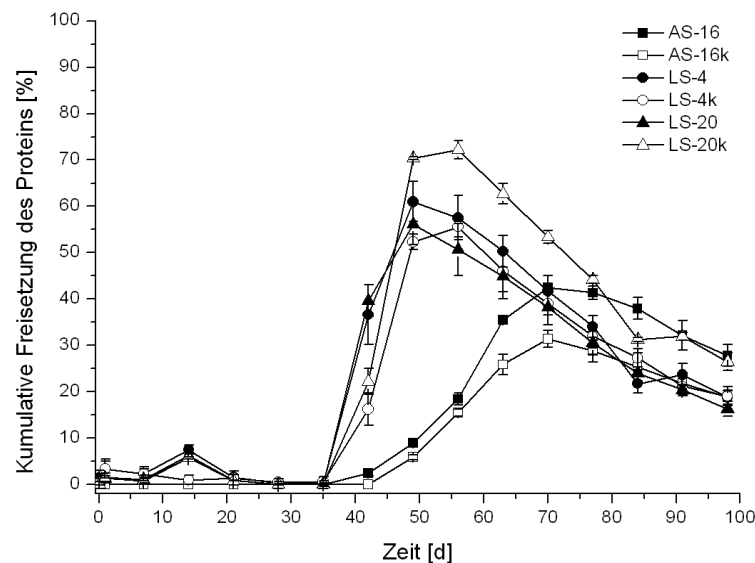


Abb. 4.13: In-vitro Freisetzung von Lysozym und Antikörper verschiedener Formulierungen mit unterschiedlicher Rührdauer

Zwanzig Prozent Sorbitol in der äußeren Phase verschoben den late burst von Lysozym aus den Mikropartikeln nicht, jedoch führte langes Rühren zu einer maximalen Freisetzung von 55% (LS-20). Die Formulierung LS-20k setzte maximal 70% frei. Anzunehmen war, dass Lysozym über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen mit dem Polymer interagierte, irreversibel an PLGA band und nicht mehr freigesetzt wurde. Wechselwirkungen zwischen Lysozym und PLGA sind bekannt. In einer Versuchsreihe wurde die Interaktion zwischen Lysozym und verschiedenen PLGA-Typen untersucht. Dazu wurden Polymerfilme erzeugt, die für zwei Stunden mit einer Lysozymbelösung inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass mehr Protein an Monoblockpolymere adsorbierte als an das verwendete Triblockcopolymer (Resomer® RGP t 50106) [Paillard-Giteau et al., 2010]. Da die Rührdauer in dieser Studie im längsten Fall achtzehn Stunden betrug, ist zu vermuten, dass sich das Adsorptionsverhalten im Laufe der Zeit ändert und mehr Protein adsorbiert. Bei der Antikörper-Formulierung AS-16 wurde dieses Phänomen nicht beobachtet. Die Freisetzungsverläufe von AS-16k und AS-16 unterschieden sich nicht. Die um 10% höhere maximale Freisetzung

bei AS-16k nach zehn Wochen war nicht signifikant, da sie innerhalb der Analysentoleranz lag. Die unterschiedlichen Rührzeiten hatten keinen Einfluss auf das Freisetzungsverhalten des Antikörpers.

In Abb. 4.14 und Abb. 4.15 sind die Freisetzungsdigramme der verschiedenen Mikropartikelformulierungen, die mit Antikörper oder Lysozym beladen wurden, dargestellt. Die Formulierungen LS-0 und AS-0, die kein Sorbitol in der äußeren Phase enthielten, zeigten ein anderes Freisetzungsverhalten als die übrigen Formulierungen. LS-0 erreichte eine initiale Freisetzung von 65% gefolgt von einer stetigen Abnahme der freigesetzten Menge. AS-0 hingegen zeigte über den gesamten Freisetzungsverlauf eine freigesetzte Menge von 20%. Der Einfluss von Sorbitol verhinderte bei allen Formulierungen den initialen burst und verzögerte die Freisetzung im Bereich von Wochen. Bei Lysozym-Formulierungen setzte der late burst nach vier Wochen ein, bei Antikörper-Formulierungen erst nach sechs Wochen. Lysozymmoleküle sind sehr viel kleiner als Antikörpermoleküle, so dass eine Freisetzung aus dem Inneren der Matrix bereits bei geringerem Degradationszustand erfolgen konnte. Um das System zu verlassen, benötigte der Antikörper größere Poren, die erst bei fortgeschrittenem Abbau des Polymers entstanden. Die Proteinfreisetzung war unabhängig von der Sorbitolkonzentration. Zwar waren geringe Unterschiede sichtbar, jedoch waren diese auf Analysenschwankungen zurück zu führen und daher nicht signifikant. Wie schon bei Lysozym beobachtet wurde, setzte sich der Antikörper ebenfalls nicht vollständig aus den Mikropartikeln über einen Zeitraum von hundert Tagen frei. Hier betrug die maximal freigesetzte Menge 50%. Es war anzunehmen, dass durch hydrophobe Wechselwirkungen das Protein an das Polymer irreversibel gebunden wurde und somit keine Freisetzung möglich war.



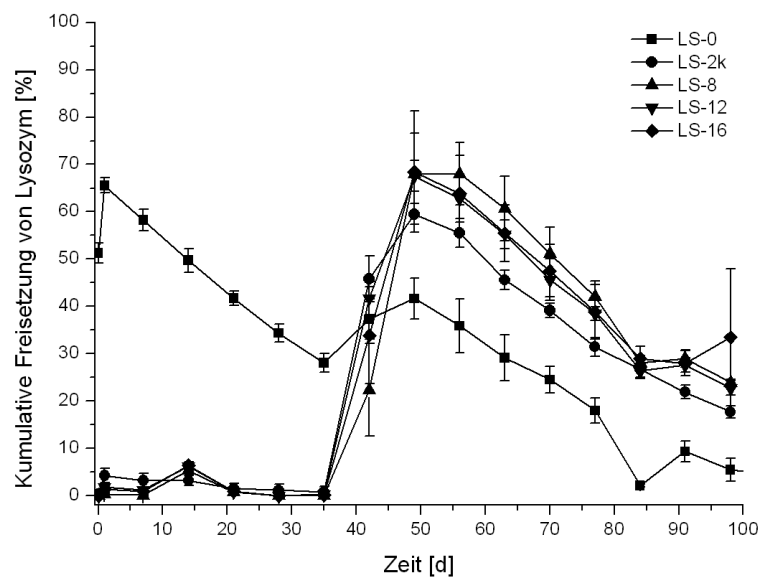


Abb. 4.14: In-vitro Freisetzung von Lysozym aus verschiedenen Formulierungen

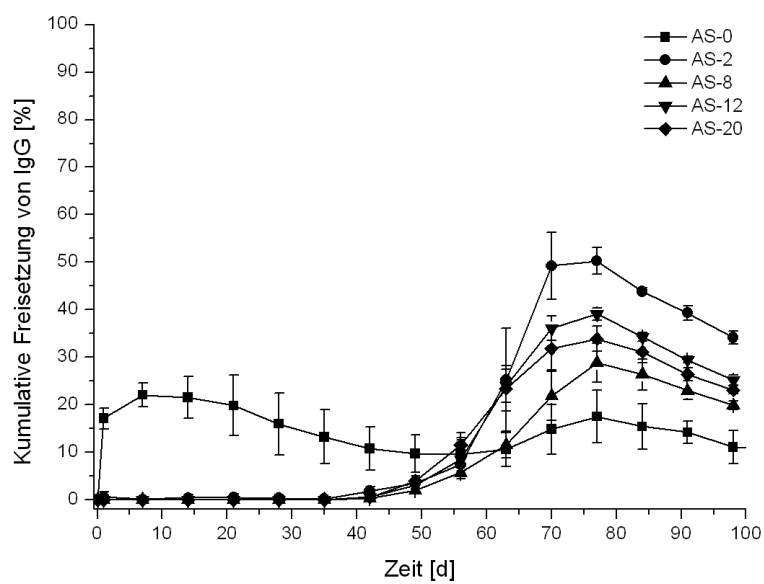


Abb. 4.15: In-vitro Freisetzung von IgG aus verschiedenen Formulierungen

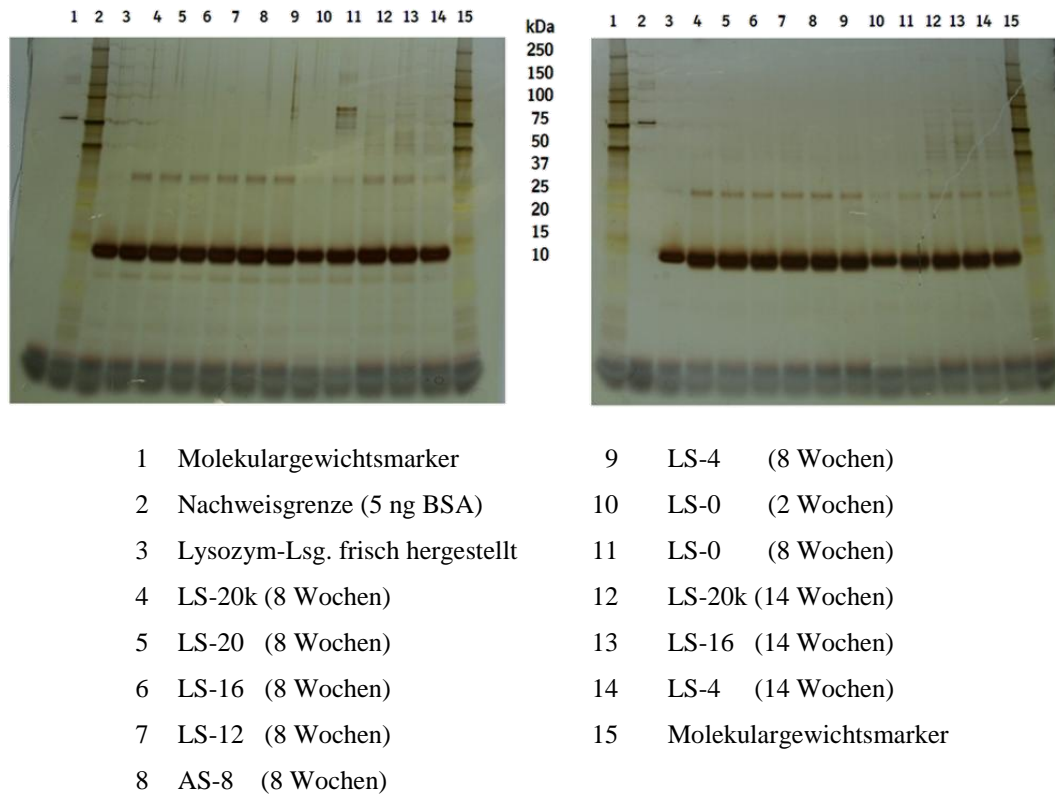
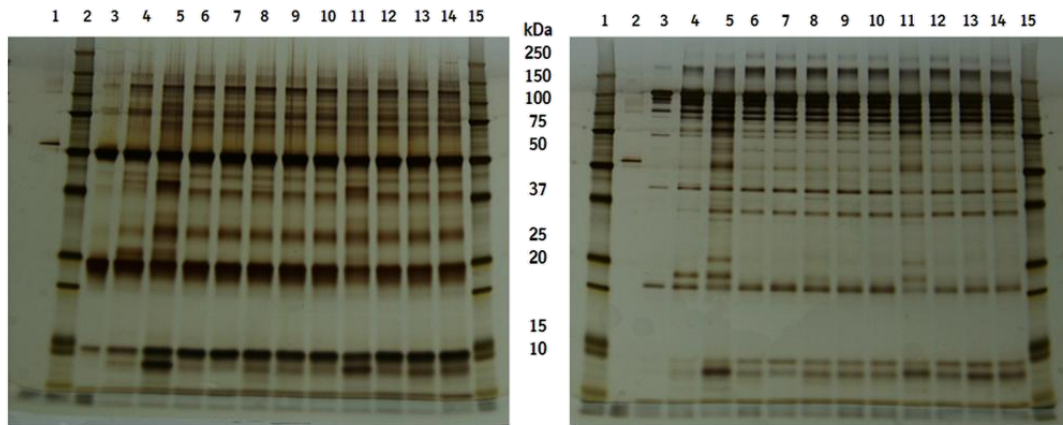


Abb. 4.16: SDS-PAGE ausgewählter Freisetzungspuren der Lysozym-Formulierungen (links: reduziert; rechts: nicht-reduziert)

In der SDS-PAGE von ausgewählten Lysozym-Freisetzungspuren (Abb. 4.16) war bei 10 - 15 kDa deutlich die Lysozymbande zu erkennen. Zusatzbanden zwischen 25 und 37 kDa traten in allen Freisetzungspuren, jedoch nur sehr schwach in der frisch hergestellten Standardlösung auf. In Reihe 11 (LS-0 8 Wochen) und in den 14-Wochen-Proben (Reihe 12 bis 14) waren oberhalb von 50 kDa Banden detektierbar. Das freigesetzte Lysozym neigte zur Aggregation. Da das Protein sowohl ohne Sorbitol (LS-0) als auch mit unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen aggregierte, hatte der Hilfsstoff keinen schützenden Einfluss auf Lysozym. Trotz Aggregation zeigten Lysozymproben nach sieben Wochen und nach vierzehn Wochen in-vitro Freisetzung hohe Aktivität (siehe Anhang Tab. 6.1).



1	Molekulargewichtsmarker	9	AS-8 (10 Wochen)
2	Nachweisgrenze (5 ng BSA)	10	AS-4 (10 Wochen)
3	Antikörper-Lsg. frisch hergestellt	11	AS-0 (14 Wochen)
4	AS-0 (1 Woche)	12	AS-20 (14 Wochen)
5	AS-0 (10 Wochen)	13	AS-16 (14 Wochen)
6	AS-20 (10 Wochen)	14	AS-4 (14 Wochen)
7	AS-16 (10 Wochen)	15	Molekulargewichtsmarker
8	AS-12 (10 Wochen)		

Abb. 4.17: SDS-PAGE ausgewählter Freisetzungspalten der Antikörper-Formulierungen (links: reduziert; rechts: nicht-reduziert)

In Abb. 4.17 ist die SDS-PAGE ausgewählter Antikörper-Freisetzungspalten dargestellt. Bei allen Freisetzungspalten traten im Vergleich zur frisch hergestellten Proteinlösung Zusatzbanden zwischen 50 und 75 kDa auf. Bei der Formulierung, die ohne Sorbitol hergestellt wurde, traten Zusatzbanden zwischen 20 und 37 kDa auf, die bei allen anderen Proben nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt waren (4, 5, 11).

Es ist festzustellen, ob die Schädigung des Proteins erst durch den Aufenthalt im Freisetzungsmedium eintrat, oder ob das Protein bereits durch den Herstellungsprozess der Mikropartikel geschädigt wurde.

Für diese Versuchsreihe lässt sich zusammenfassen, dass die Herstellung von Mikropartikeln mit Methylcellulose und Sorbitol in der äußeren Phase erfolgreich war und sich dadurch die Verkapselungsrate verbessern ließ. Einen großen Einfluss hatte der Einsatz von Sorbitol auf das Freisetzungsverhalten. Die Freiset-

zung der Proteine verlief ohne initial burst. In Abhängigkeit des Proteins setzte eine kontinuierliche Freisetzung nach vier Wochen (Lysozym) oder nach sechs Wochen (Antikörper) ein.

#### **4.4 Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab**

Die Herstellung von Mikropartikeln im Labormaßstab erfolgte problemlos. Um die Produktion von Mikropartikeln in der pharmazeutischen Industrie zu etablieren, ist es notwendig, den Prozess zu skalieren. Für die Skalierung in den technischen Maßstab stand eine Apparatur (siehe Abb. 4.18 ) zur Verfügung die für diesen Versuch genutzt werden sollte. Die Anlage bestand aus einem doppelwandigen, konischen Glasgefäß mit Auslass, das durch einen Deckel vakuumdicht verschlossen wurde. Die Apparatur verfügte über einen Ankerrührer mit einer Leistung von maximal 200 U/min und einem Homogenisiergerät mit einer Maximalleistung von 15000 U/min. Die Rührer wurden über eine Steuereinheit bedient. An den Laborreaktor war ein Thermostat angeschlossen, um den Gefäßinhalt zu temperieren.

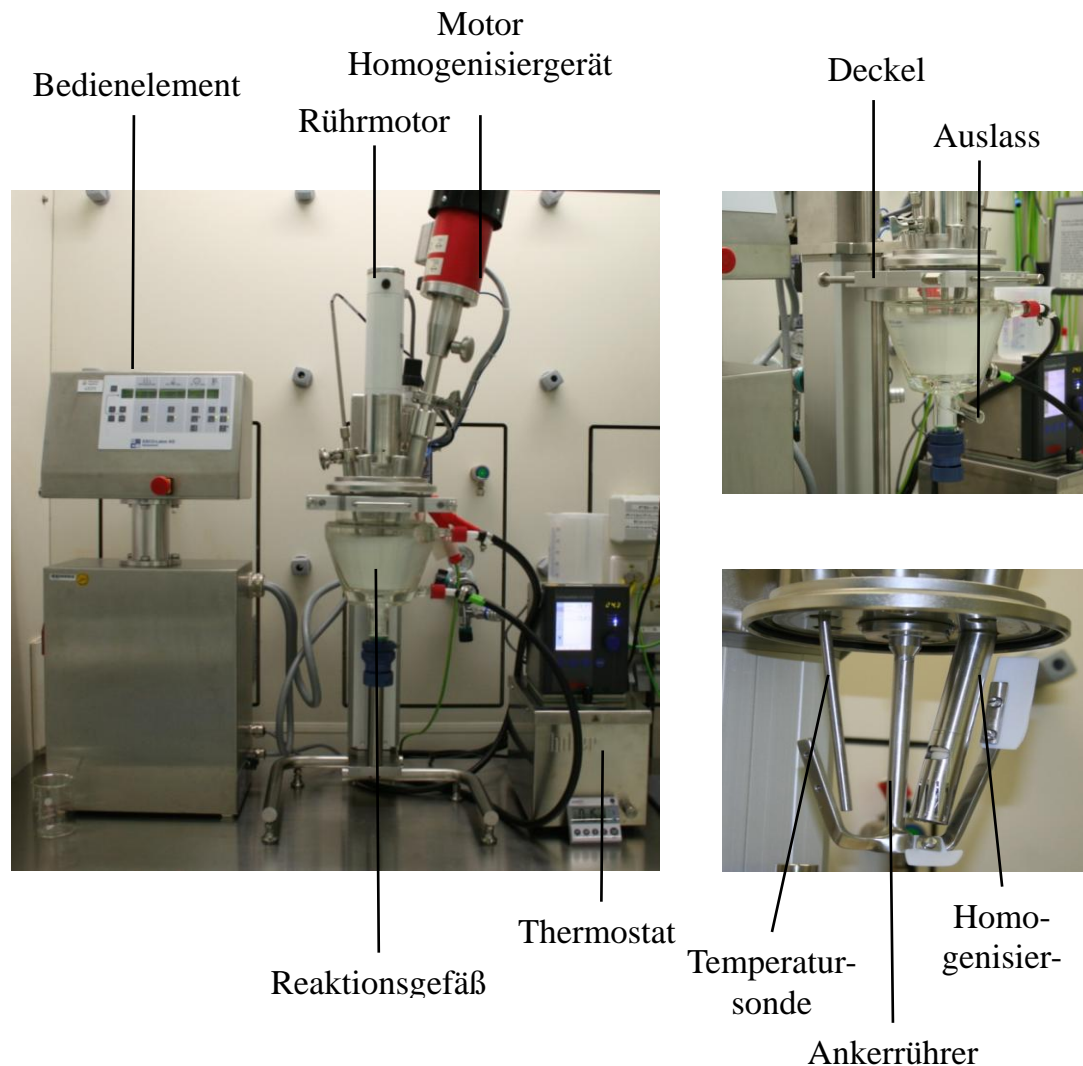


Abb. 4.18: Laborreaktor für die Mikropartikelherstellung im technischen Maßstab

#### 4.4.1 Prozessentwicklung

Da für die Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab die Apparatur vorgegeben war, waren einige Faktoren zu beachten, die die Skalierung nicht unkompliziert machten. Einige Prozessparameter mussten an die neuen Gegebenheiten angepasst werden, da zum Beispiel der Ankerrührer maximal 200 U/min leisten konnte, wohingegen die Doppelemulsion im Labormaßstab bei 1000 U/min gerührt wurde.

Die Prozessentwicklung wurde mit dem Monoblockpolymer Resomer® RG 504H durchgeführt. Als Modellprotein wurde BSA ausgewählt und mit 6%

in die Polymermasse eingearbeitet. Die Primäremulsion wurde mittels Ultraschall hergestellt. Die äußere Phase bestand aus wässriger Methylcellulose-Lösung (MC 15). Pro Ansatz wurde ein Prozessparameter verändert. Eine Übersicht der hergestellten Ansätze ist in Tab. 4.11 dargestellt.

Tab. 4.11: Formulierungen zur Prozessentwicklung im technischen Maßstab

<b>Formu- lierung</b>	<b>Anker- rührer [U/min]</b>	<b>Homogenisier- gerät [U/min]</b>	<b>Volumen W2 [mL]</b>	<b>Konzen- tration W2 [%]</b>	<b>Rühr- dauer [h]</b>
<b>T1</b>	200	-	300	2,75	3
<b>T2</b>	100	1000	350	2,75	3
<b>T3</b>	100	2000	350	2,75	3
<b>T4</b>	100	1500	350	2,75	3

Zur Beurteilung der hergestellten Mikropartikel wurde hauptsächlich die Partikelgröße herangezogen. Alle weiteren Kenndaten wurden ebenfalls erzeugt und in Tab. 4.12 dargestellt.

Tab. 4.12: Analysenergebnisse der Formulierungen

<b>Formu- lierung</b>	<b>Ausbeute [%]</b>	<b>Partikelgröße</b>		<b>Verkapselungsrate [%]</b>
		<b>VMD [µm]</b>	<b>D<sub>90</sub> [µm]</b>	
<b>T1</b>	78	84	137	61
<b>T2</b>	85	89	163	91
<b>T3</b>	79	46	78	87
<b>T4</b>	82	54	91	89

Formulierung T1 wurde hergestellt, indem der Ankerrührer der Apparatur zum Rühren der Doppalemulsion genutzt wurde. Das hatte zur Folge, dass sehr große Partikel mit einem mittleren, volumenbezogenen Durchmesser von 84 µm entstanden. Die Partikel waren porös und neigten zur Agglomeration (Abb. 4.19). Zur Verringerung der Partikelgröße wurde für Formulierung T2 der Ultraturrax

mit einer Rührgeschwindigkeit von 1000 U/min hinzugeschaltet. Das Volumen der äußeren Phase wurde erhöht und die Geschwindigkeit des Ankerrührers auf 100 U/min reduziert, damit der Ultraturrax vollständig in die Doppelemulsion eintauchte und keine Luft zog. Die Mikropartikel von T2 erhielten eine mittlere, volumenbezogene Größe von 89 µm. Die Rührbedingungen reichten noch nicht aus, um die Partikelgröße zu verringern.

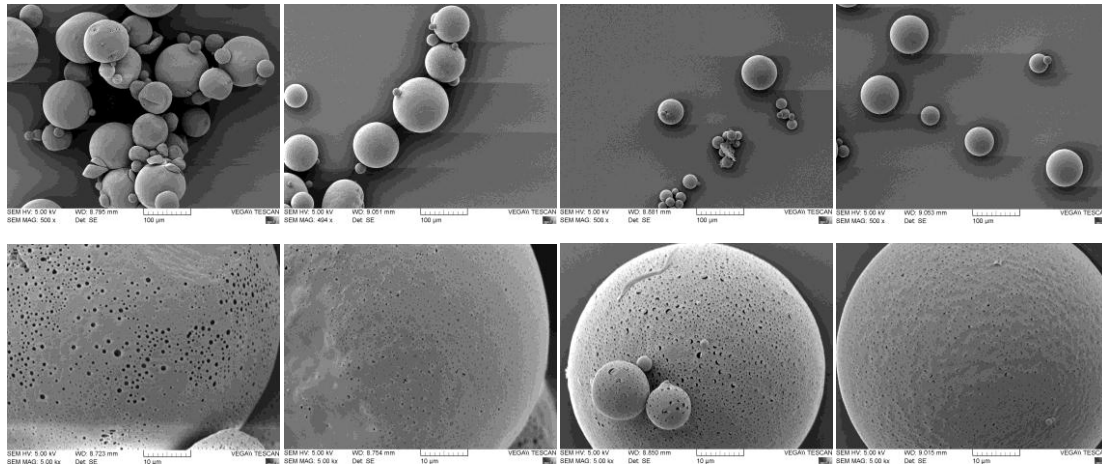


Abb. 4.19: REM-Aufnahmen der Formulierungen T1 bis T4 (v.l.n.r.)

Durch Erhöhung der Geschwindigkeit des Homogenisiergeräts auf 2000 U/min konnte bei Formulierung T3 eine moderate Partikelgröße von 46 µm erzielt werden. Allerdings entstanden durch den hohen Energieeintrag sehr poröse Partikel (Abb. 4.19). Mit einer Homogenisiergeschwindigkeit von 1500 U/min erzielte Formulierung T4 eine Partikelgröße von 54 µm. Hervorzuheben ist, dass die Ausbeute aller Mikropartikel-Formulierungen durchgehend sehr hoch war und dass die Verkapselungsrate ab Formulierung T2 durchschnittlich bei 89% lag. Mit diesen zufriedenstellenden Ergebnissen waren die Prozessparameter festgelegt.



#### 4.4.2 Reproduzierbarkeit

Der entwickelte Prozess wurde auf Reproduzierbarkeit getestet. Dazu wurde an drei verschiedenen Tagen jeweils eine Charge Mikropartikel im technischen Maßstab hergestellt. Die Mikropartikel wurden hergestellt mit Resomer® RG 504H und 6% BSA.

In Tab. 4.13 sind die Analysenergebnisse aller Chargen sowie der Mittelwert aus drei Chargen dargestellt. Die Ausbeute lag durchschnittlich bei  $81 \pm 3\%$ . Bei der Verkapselungsrate trat eine größere Abweichung zwischen #1 mit 89% und #2 und #3 mit 82% auf. Dieser Unterschied war jedoch auf Analysenschwankungen zurückzuführen und hatte keinen Einfluss auf das Gesamtergebnis, das mit  $84 \pm 4\%$  zufriedenstellend war.

Tab. 4.13: Analysenergebnisse aller Chargen

Formulierung	Ausbeute [%]	Partikelgröße		Verkapselungsrate [%]
		VMD [ $\mu\text{m}$ ]	Spannweite	
#1	82	54	1,35	89
#2	78	60	1,30	82
#3	84	60	1,36	82
<b>Mittelwert</b>	$81 \pm 3$	$58 \pm 3$	$1,34 \pm 0,03$	$84 \pm 4$

Die Partikelgröße lag durchschnittlich bei  $58 \pm 3 \mu\text{m}$ . Die Partikelgrößenverteilung mit einer Spannweite von  $1,34 \pm 0,03$  lag unter 2,0 und lag somit im akzeptablen Bereich. Die Partikelmorphologie aller drei Chargen war gleich. Die Partikel waren kugelförmig mit einer porösen Oberfläche. Die Querschnittsaufnahmen zeigten eine poröse Innenstruktur. Es fiel auf, dass #1 die kleinsten Poren hervorbrachte, wohingegen #2 sehr große Poren aufwies. Das Porenmuster in #3 schien eine Mischung aus #1 und #2 zu sein (Abb. 4.20).

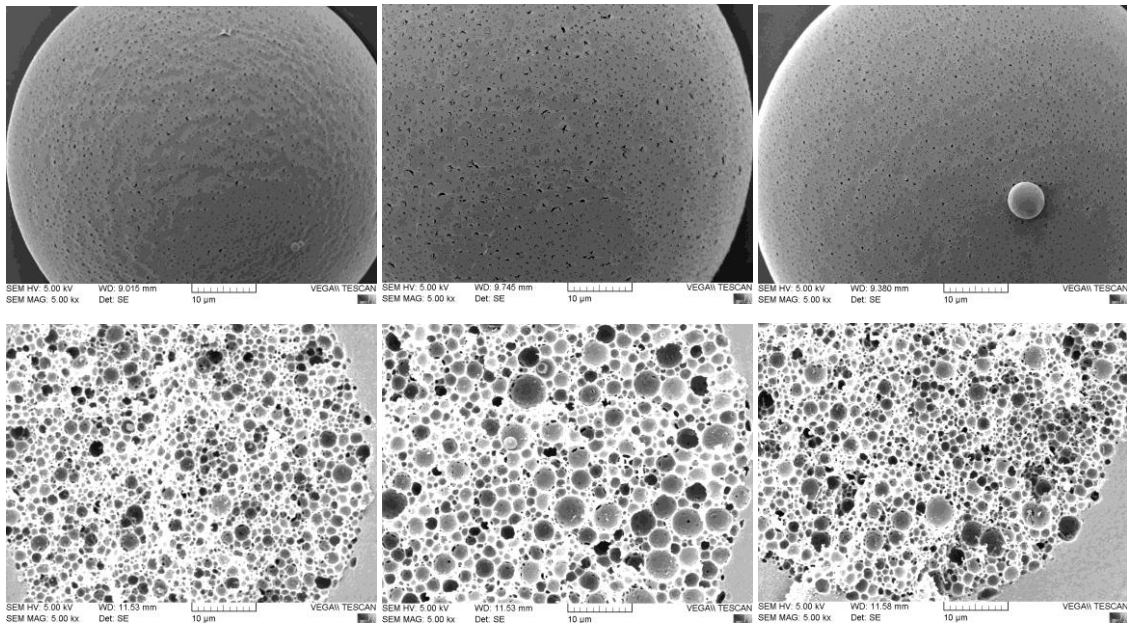


Abb. 4.20: REM-Aufnahmen von Oberfläche und Querschnitt der Mikropartikel (#1, #2, #3 v.l.n.r.)

Die Unterschiede in der Innenmorphologie der Mikropartikel spiegeln sich in der in-vitro Freisetzung der einzelnen Chargen wider (Abb. 4.21). Der Freisetzungsverlauf aller drei Chargen war gleich, jedoch unterschieden sich die Freisetzungsraten erheblich voneinander. #2 hatte die grobmaschigste Innenstruktur und wies den höchsten initial burst mit 50% auf. #1 erreichte initial 35% und #3 ca. 25%. Im Mittel schwankte die Freisetzung aller drei Chargen um 10%, was den Analysenschwankungen entsprach.

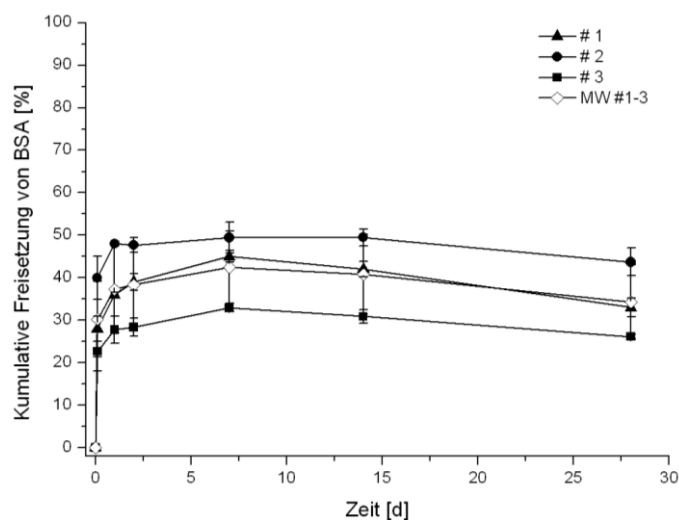


Abb. 4.21: In-vitro Freisetzung aller drei Chargen sowie deren Mittelwert

Im technischen Maßstab ließen sich Mikropartikel mit einheitlicher Chargenbeschaffenheit herstellen. Drei Chargen, die an unterschiedlichen Tagen im technischen Maßstab hergestellt wurden, stimmten in Ausbeute, Partikelgröße und Verkapselungsrate überein. Die innere Morphologie der Partikel wies Unterschiede in der Porengröße auf, die die Freisetzung geringfügig beeinflusste.

#### **4.4.3 Vergleich von Labormaßstab mit technischem Maßstab**

Die Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab ist möglich. In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob der Herstellprozess im Labormaßstab auf den technischen Maßstab übertragbar war. Dazu wurden im Labormaßstab drei Chargen (LM) und im technischen Maßstab eine Charge (TM) Mikropartikel hergestellt, die aus dem Triblockcopolymer Resomer® RGP t 50106 und 6% Lysozym bestanden. Die Prozessparameter sind in Tab. 4.14 aufgelistet. Der Ansatz im technischen Maßstab war das Zehnfache einer Charge des Labormaßstabs. Das Volumen der äußeren Phase im technischen Maßstab betrug jedoch nicht das zehnfache Volumen des Labormaßstabs, da die Rührbedingungen des Ankerrührers ein größeres Volumen als 350 mL nicht zuließen. Die Konzentration an Methylcellulose war in beiden Ansätzen an die eingesetzte Polymermenge angepasst, so dass die Volumenreduktion keinen Einfluss auf die Partikeleigenschaften hatte. Die Rührbedingungen entsprachen den für den jeweiligen Prozess evaluierten Parametern.

Tab. 4.14: Herstellbedingungen Labormaßstab und technischer Maßstab

Prozessparameter	Labormaßstab	Technischer Maßstab
<b>Volumen Proteinlösung:</b>	74 µL	740 µL
<b>Einwaage Polymer:</b>	243 mg	2430 mg
<b>Volumen O-Phase:</b>	2 mL	20 mL
<b>Ultraschallbedingungen:</b>	30 s, 60 W	60 s, 120 W
<b>W2-Phase:</b>	1,2 g MC 15 + 4% Sorbitol	12,2 g MC 15 + 4% Sorbitol
<b>Volumen W2-Phase:</b>	45 mL	350 mL
	1000 U/min, 15 min	100 U/min
	(Flügelrührer);	(Ankerrührer)
<b>Rührbedingungen:</b>	anschließend	kombiniert mit
	300 U/min, 3 h	1500 U/min
	(Magnetrührer)	(Ultraturrax), 3 h

In Tab. 4.15 wurden die Analysenergebnisse dargestellt. Die Ausbeute beider Ansätze unterschied sich erheblich voneinander. Im Labormaßstab wurden durchschnittlich 75% Mikropartikel gewonnen, im technischen Maßstab hingegen war die Ausbeute viel größer und betrug 89%. Die höhere Ausbeute war darauf zurückzuführen, dass die Mikropartikelsuspension durch den Auslass im Rührgefäß vollständig entnommen werden konnte und somit keine Rückstände zurückblieben wie im Becherglas (LM).

Im Vergleich beider Ansätze war kein signifikanter Unterschied in der Verkapselungsrate feststellbar.

Tab. 4.15: Analysenergebnisse der beiden Ansätze

Formulierung	Ausbeute [%]	Partikelgröße		Verkapselungsrate [%]
		VMD [µm]	Spannweite	
<b>LM</b>	75 ± 2	52 ± 5	1,51 ± 0,10	85 ± 3
<b>TM</b>	89	55	1,23	78

Die Mikropartikel, die im Labormaßstab hergestellt wurden, waren im Durchschnitt 52 µm groß und hatten eine Partikelgrößenspanne von 1,51. Die meisten Partikel waren kugelförmig mit unebener Oberflächenstruktur, jedoch gab es deformierte Partikel, die oval oder stäbchenförmig waren (Abb. 4.22). Die Mikropartikel, die im technischen Maßstab gefertigt wurden, hatten die gleiche Größe. Allerdings war die Spannweite der Partikel geringer, was auf eine gleichförmigere Verteilung schließen ließ. In den REM-Aufnahmen waren sphärische Partikel zu erkennen, die eine raue Oberfläche besaßen. Trotz der übereinstimmenden, äußeren Morphologie unterschied sich die innere Struktur der Partikel voneinander. Die LM-Partikel zeigten ein gleichmäßiges, feinmaschiges Netz aus Poren, wohingegen die Poren der TM-Partikel unregelmäßiger und größer erschienen (Abb. 4.22).

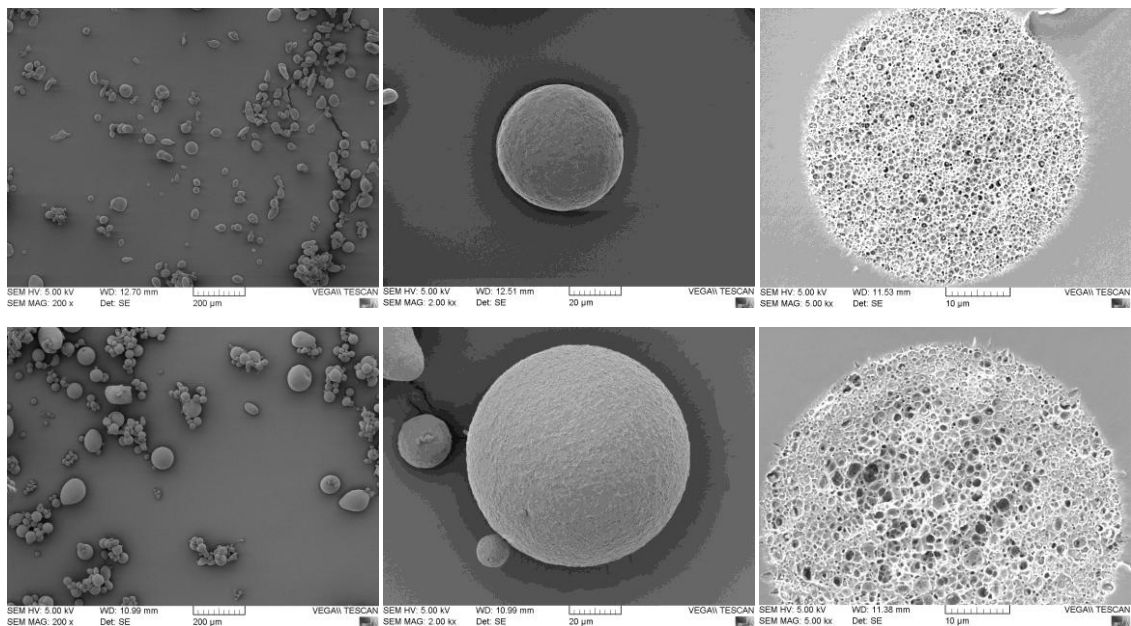


Abb. 4.22: REM-Aufnahmen der äußeren und inneren Morphologie (LM oben, TM unten)

Die Unterschiede in der inneren Morphologie der Mikropartikel spiegeln sich in der in-vitro Freisetzung des Lysozyms wider (Abb. 4.23). Die Proteinfreisetzung aus den LM-Mikropartikeln zeichnete sich durch keinen initial burst aus. Der late burst setzte nach fünf Wochen ein. Maximal wurden 55% Lysozym freigesetzt. TM-Mikropartikel hatten eine grob poröse innere Struktur und setzten

initial 20% Lysozym frei, gefolgt von einem late burst nach vier Wochen und einer maximalen Freisetzung von 55% Lysozym. Wahrscheinlich waren die innere Struktur der Mikropartikel und damit auch die Veränderungen im Freisetzungsprofil geprägt durch unterschiedliche Dichlormethan-Verdampfungsraten während der Mikropartikel-Herstellung. Die Rührer der Apparatur für den technischen Maßstab konnten nur betrieben werden, indem der Deckel auf dem Reaktionsgefäß aufgesetzt war. Dadurch entstand ein geschlossenes System. Die Verdampfung des Lösungsmittels erfolgte nur durch zwei Öffnungen ( $\varnothing$  ca. 5 cm) im Deckel und war dadurch langsamer als die Verdampfung im Labormaßstab. Im kleinen Maßstab bestand der Versuchsaufbau aus einem Becherglas, das einen Durchmesser von ca. 7 cm hatte und komplett offen war. Die Verdampfung konnte hier schneller erfolgen und zu einer feineren Porenverteilung im Inneren der Partikel führen.

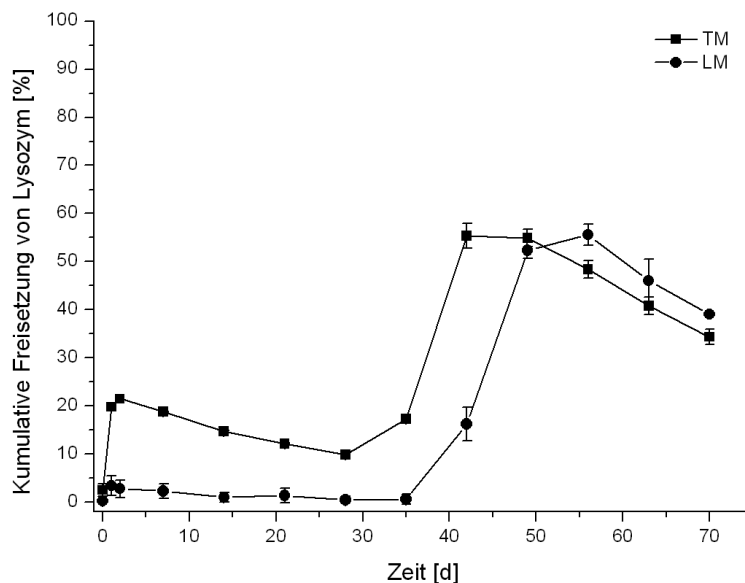


Abb. 4.23: In-vitro Freisetzung

Bei reduzierter Verdampfungsrate und somit langsamer Aushärtung der Mikropartikel war es möglich, dass die Tröpfchen der inneren Phase koaleszierten und eine großporige, innere Struktur entstand. Die Verdampfung von Dichlormethan wurde durch das Anlegen eines Vakuums, durch Temperaturerhöhung oder durch

Vorbeiströmen von Stickstoff an der Luft/Flüssigkeitsgrenzfläche beschleunigt [Wang et al., 1999].

Hinsichtlich Partikelgröße und Verkapselungsrate waren die Mikropartikel des technischen Maßstabs mit den Mikropartikeln vergleichbar, die im Labormaßstab hergestellt wurden. Unterschiede gab es in der inneren Struktur der Mikropartikel und in der in-vitro Freisetzung des verkapselten Proteins. Diese Differenzen waren auf den apparativen Aufbau des Systems für den technischen Maßstab zurückzuführen. Um Formulierungen im Labormaßstab zu entwickeln und sie anschließend in den technischen Maßstab zu übertragen, ist es erforderlich, den Aufbau des größeren Systems zu optimieren, um eine einheitliche Verdampfungsrate zu erzielen und Mikropartikel zu erzeugen, die in allen Kenndaten übereinstimmen.

## 4.5 Lagerstabilität

Die Stabilität einer pharmazeutischen Darreichungsform ist von großer Bedeutung, da sie Auskunft über die Wirkstoff- und Produktqualität gibt. Auf Grundlage von Stabilitätsdaten, die über einen längeren Zeitraum bei unterschiedlichen Klimabedingungen durchgeführt werden, wird die Haltbarkeit eines Arzneimittels festgelegt. Es gibt wenige Studien, die sich mit der Stabilität von PLGA-Mikropartikeln beschäftigen. Zum Beispiel wurde die Stabilität Piroxicam-beladener PLGA-Mikropartikel bei 0 °C und 5 °C über zwölf Monate belegt [Puthli et al., 2009b] oder es wurde bei erhöhter Temperatur (> 70 °C) eingelagert, um über die Arrhenius-Gleichung, die den Zusammenhang zwischen Temperatur und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten darstellt, eine Lagerstabilität zu errechnen [Schaefer et al., 2001]. Bereits auf dem Markt befindliche Mikropartikel-Zubereitungen wie Decapeptyl von Ferring haben Haltbarkeiten von drei Jahren bei kühler Lagerung von 2 – 8 °C [Ferring Arzneimittel, 2010]. Dennoch ist die Stabilität von Proteinen während der Lagerung kritisch, da chemische Abbauprozesse sowie Polymer-Protein-Interaktionen das verkapselte Protein schädigen können [Hennink et al., 2000]. Die Stabilität von Protein-beladenen PLGA-Mikropartikeln ist sehr stark von der Formulierungszusammensetzung und vom verwendeten Protein abhängig. Aus diesem Grund wurde eine Lagerstabilität von drei verschiedenen Mikropartikel-Formulierungen durchgeführt. Alle Formulierungen wurden unter gleichen Bedingungen im technischen Maßstab hergestellt. Als Modellproteine wurden Lysozym, BSA und der IgG-Antikörper verwendet. Basis aller Formulierungen war das Triblockcopolymer Resomer ® RGP t 50106 (Tab. 4.16). Die äußere Phase bestand aus Methylcellulose und 16% Sorbitol.



Tab. 4.16: Zusammensetzung der Formulierungen

Formulierung	Polymer	Protein	Theoretische Beladung [%]
L1	50106	BSA	6
L2	50106	Lysozym	6
L3	50106	Antikörper	6

Um eine ausreichende Mikropartikelausbeute zu erhalten, wurden vier Chargen pro Formulierung hergestellt. Nach der Herstellung wurden die Chargen sofort bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nachdem alle Chargen aller Formulierungen produziert und eingefroren worden waren, wurde die Lyophilisation durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass alle Chargen einheitlich waren, wurde nach der Zentrifugation von jeder Charge eine Probe entnommen, die nicht lyophilisiert, sondern über 24 h im Vakuumschrank bei  $< 100\text{ mbar}$  getrocknet wurde. Von diesen Proben wurde die Verkapselungsrate bestimmt. Diese schwankte bei allen Formulierungen maximal um 3% (Abb. 4.24). Die Chargen waren homogen.

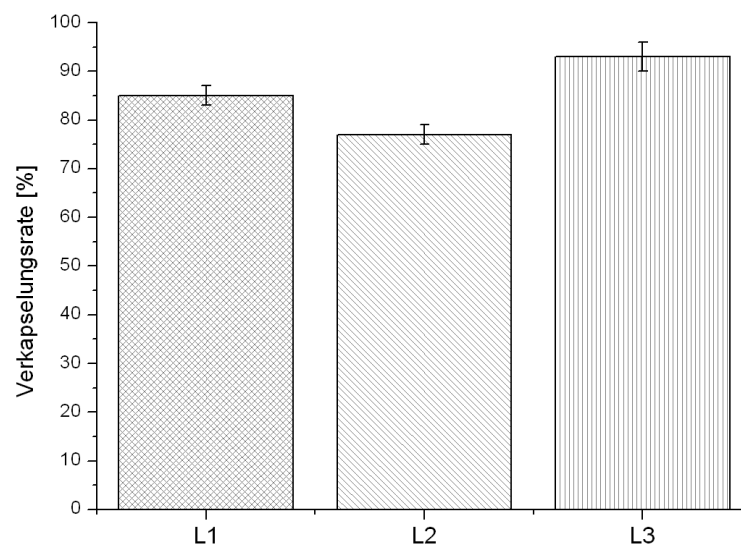


Abb. 4.24: Chargenhomogenität überprüft durch die Verkapselungsrate

Nach der Lyophilisation wurden jeweils die Chargen derselben Formulierung in einen 50 mL Glasvial gepoolt und im Turbulamischer für zehn Minuten bei 40 U/min gemischt. Anschließend wurden die Formulierungen in 6 mL Glasvials

portioniert, mit Stopfen sowie Bördelkappe verschlossen und bei 5 °C und 25 °C/60% rF eingelagert. Der Startwert wurde direkt nach der Lyophilisation von nicht eingelagertem Material bestimmt.

In den REM-Aufnahmen in Abb. 4.25 war zu erkennen, dass alle Formulierungen einheitlich große Mikropartikel hervorbrachten. Die Partikel waren sphärisch mit einer rauen Oberfläche. Es trat keine Agglomeration der Partikel auf. Die Innenmorphologie war bei allen drei Formulierungen ähnlich und zeichnete sich durch ein feinmaschiges Porengerüst aus. Nach einem Monat Lagerung bei 5 °C und bei 25 °C/60% rF waren kaum Veränderungen in der Partikelmorphologie zu sehen. Lediglich Formulierung L2 zeigte in der Übersichtsaufnahme bei 100 x Vergrößerung Agglomeration (Abb. 6.8). Die Partikel von Formulierung L1 und L2 hatten eine mittlere, volumenbezogene Größe von 60 µm, wohingegen Formulierung L3 etwas größere Partikel mit einem VMD von 75 µm hervorbrachte. Während der Lagerung veränderte sich die Partikelgröße nicht signifikant. Schwankungen um 10 µm fielen unter die Analysentoleranz (Abb. 4.26).

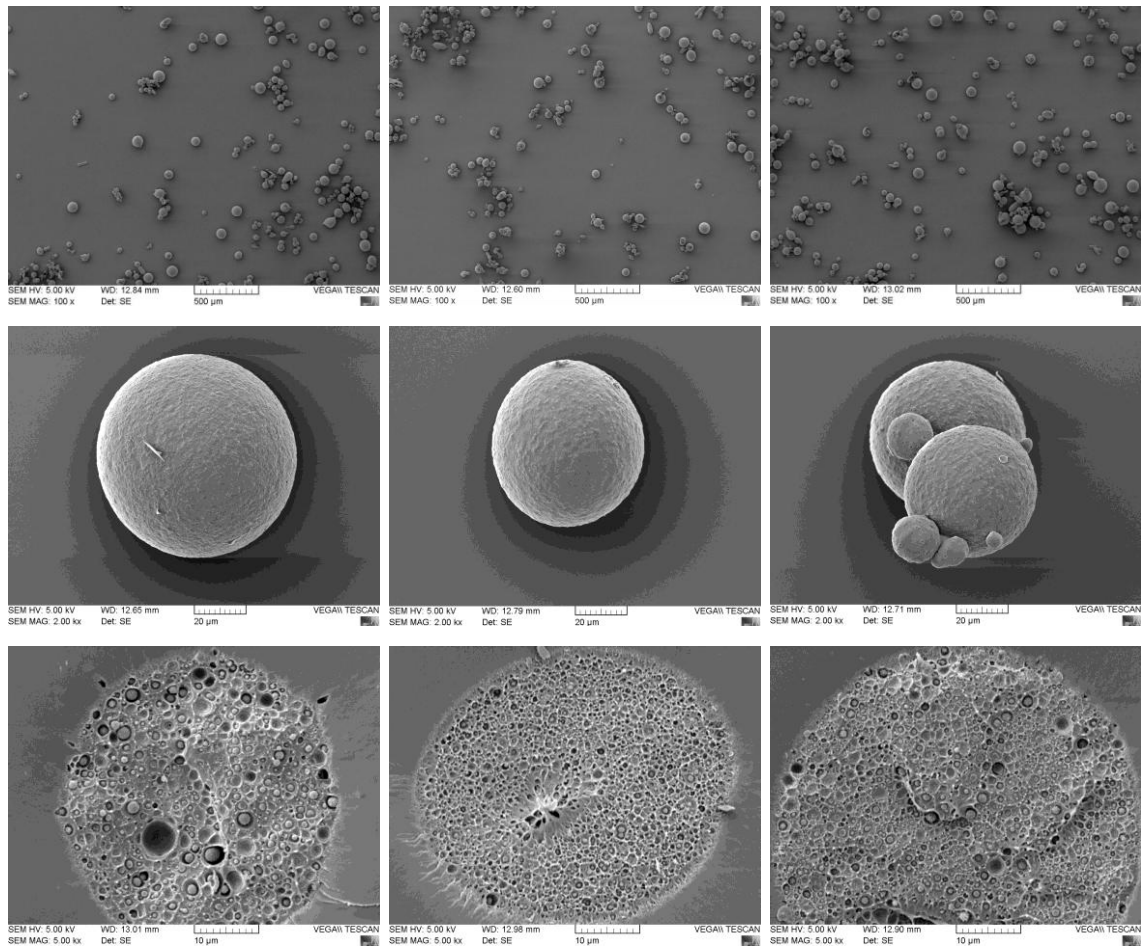


Abb. 4.25: REM-Aufnahmen Startwert Lagerstabilität (Übersicht 100 x, Oberfläche 2 kx, Querschnitt 5 kx; L1, L2, L3 v.l.n.r.)

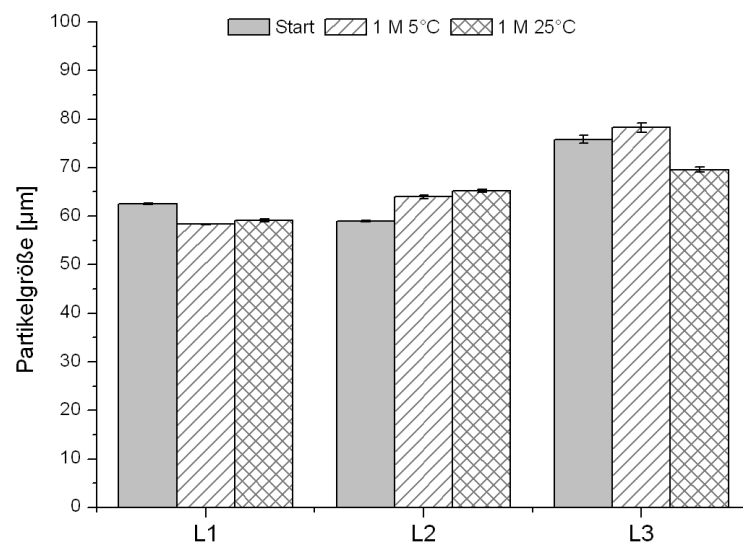


Abb. 4.26: Partikelgröße aller Formulierungen (Start und nach 1 Monat)

Die Verkapselungsrate der Formulierungen L1 und L2 lag bei ca. 80%. Der IgG-Antikörper ließ sich etwas besser verkapseln und erreichte eine Rate von 90%. Innerhalb eines Monats bei unterschiedlicher Lagerung veränderte sich die Verkapselungsrate der einzelnen Formulierungen nicht. Analysenschwankungen von bis zu 10% waren akzeptabel.

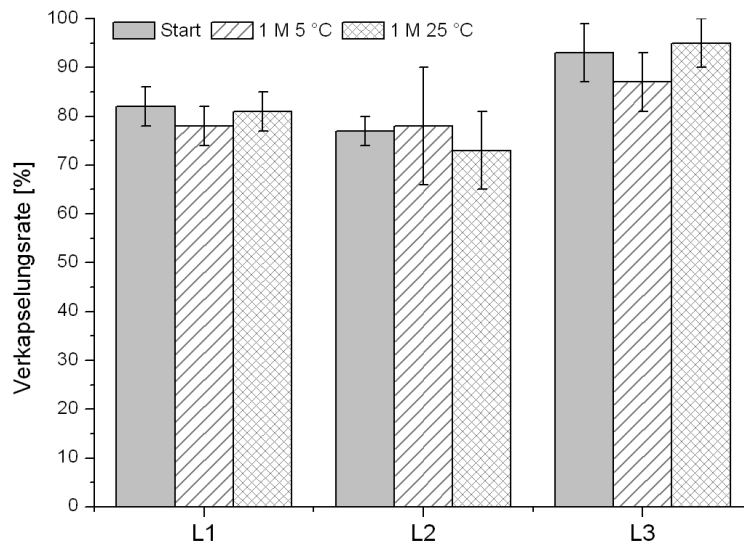


Abb. 4.27: Verkapselungsrate aller Formulierungen (Start und nach 1 Monat)

In Tab. 4.17 ist die Veränderung des Wassergehalts und der Glasübergangstemperatur aufgelistet. Der Wassergehalt aller Formulierungen betrug nach der Lyophilisation durchschnittlich 0,5% und entsprach damit den Anforderungen an ein Lyophilisat, das nicht mehr als 2% Restfeuchte enthalten sollte. Nach einem Monat Lagerung hatte sich der Wassergehalt bei allen Formulierungen verdoppelt. Der Anstieg im Wassergehalt wurde bereits bei PLGA-Nanopartikeln beobachtet, die mit einem Antikörper beladen waren und über dreizehn Wochen bei unterschiedlichen Klimabedingungen gelagert wurden. Da das Lyophilisat Stabilisatoren wie Trehalose, Sucrose oder Mannitol enthielt, wurde die erhöhte Restfeuchte mit Kristallisation von Hilfsstoffen oder Freisetzung von Kristallwasser aus Hilfsstoffen begründet [Holzer, 2010]. Denkbar war auch die Durchlässigkeit von Feuchtigkeit durch den verwendeten Stopfen.

Die Glasübergangstemperaturen aller Formulierungen lagen zu Beginn bei 27,1 °C. Die Lagerung über einen Monat bei verschiedenen Klimabedingungen

wirkte sich unterschiedlich auf die Formulierungen aus. Bei Formulierung L1 lag der Glasübergangspunkt um 1 bis 2 °C unter dem Startwert. Vorstellbar war, dass das Restwasser einen weichmachenden Einfluss auf das Polymer ausübte. Dieser Effekt wurde in einer anderen Studie an reinem PLGA beobachtet, das bei unterschiedlichen Luftfeuchten gelagert wurde und Wasser adsorbierte. Die Proben besaßen abhängig von der Luftfeuchtigkeit verschiedene Restfeuchten. Je höher der Wassergehalt im Polymer war, desto niedriger war der  $T_g$  [Blasi et al., 2005]. Formulierung L2 zeigte hingegen keine Veränderung in der Glasübergangstemperatur. Mit 1,5 °C war der  $T_g$  von Formulierung L3, die einen Monat bei 25 °C/60% rF lagerte, höher als der Ausgangswert. Polymeralterung wurde bereits anderweitig an Monoblock- PLGA-Mikropartikeln untersucht, die verschiedene Emulgatoren wie z.B. das aus PEG aufgebaute Triton-X enthielten. Es wurde beobachtet, dass bei einer Alterungstemperatur von 35 °C die Glasübergangstemperatur über einen Zeitraum von zwölf Stunden um 1,9 °C zunahm [Rouse et al., 2007]. Die irreversibel ablaufenden chemischen und physikalischen Vorgänge im verwendeten Polymer waren daher bei dieser Lagerstabilität mit unterschiedlichen Klimabedingungen möglich.

Tab. 4.17: Wassergehalt und Glasübergangstemperatur aller Formulierungen (Start und nach 1 Monat)

Formulierung	Wassergehalt [%]		Glasübergangstemperatur [°C]	
	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
<b>L1 – Start</b>	0,51		27,6	
<b>L1 – 1 Monat</b>	0,98	0,77	25,4	26,4
<b>L2 – Start</b>	0,47		26,3	
<b>L2 – 1 Monat</b>	0,75	0,84	26,1	25,9
<b>L3 – Start</b>	0,46		27,4	
<b>L3 – 1 Monat</b>	0,80	0,73	27,7	28,9

Die in-vitro Freisetzung aller Formulierungen zeichnete sich durch einen nicht vorhandenen initial burst aus. Die Freisetzung des Proteins setzte nach fünf Wo-

chen für Formulierung L1 und L2 sowie nach sechs Wochen für Formulierung L3 ein (Abb. 4.28 bis Abb. 4.30). In Kapitel 4.4.3 wurden Mikropartikel miteinander verglichen, die im Labormaßstab und im technischen Maßstab hergestellt wurden. Es zeigte sich, dass die innere Morphologie und die in-vitro Freisetzung beider Ansätze nicht übereinstimmten. Wahrscheinlich war diese Unstimmigkeit von der Formulierungszusammensetzung abhängig. Vergleich man Formulierung LS-16 und AS-16 (LM) aus Kapitel 4.3.3 mit den Formulierungen L2 und L3 (TM) aus diesem Kapitel, so harmonisierten die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung sowie die in-vitro Freisetzung des jeweiligen Proteins von Formulierungen des Labormaßstabs mit denen des technischen Maßstabs. Über einen Lagerzeitraum von einem Monat bei unterschiedlichen Klimabedingungen veränderte sich die in-vitro Freisetzung der Proteine aller Formulierungen nicht. Die Freisetzungsverläufe entsprachen denen der Startwerte aller Formulierungen.

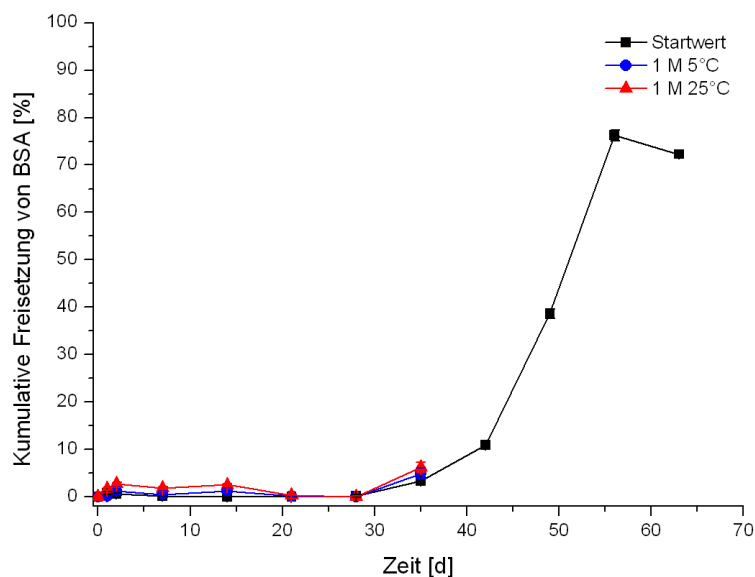


Abb. 4.28: In-vitro Freisetzung der Formulierung L1 (Start und nach 1 Monat)

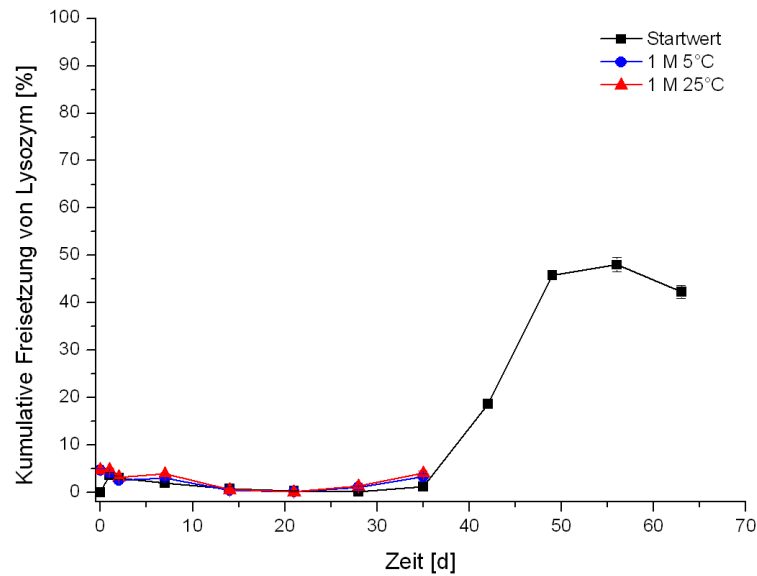


Abb. 4.29: In-vitro Freisetzung der Formulierung L2 (Start und nach 1 Monat)

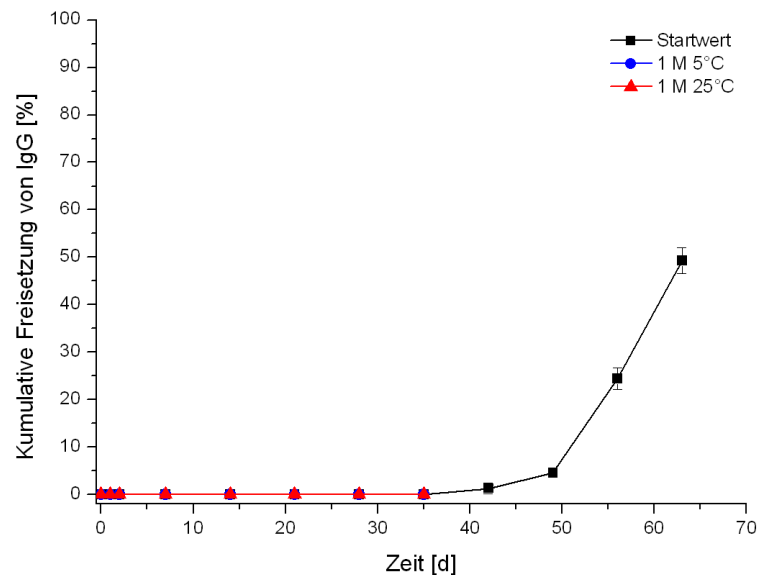


Abb. 4.30: In-vitro Freisetzung der Formulierung L3 (Start und nach 1 Monat)

Innerhalb eines Monats blieben alle Formulierungen bei 5 °C und bei 25 °C stabil. Da die in-vitro Freisetzung aus Mikropartikeln, die einen Monat bei unterschiedlichen Temperaturen eingelagert waren, zum Abschluss dieser Arbeit das Protein noch nicht freigesetzt hatten, kann über Veränderungen im Freisetzungsprofil keine Aussage getroffen werden. In einer anderen Studie zeigte sich, dass BSA aus gelagerten Mikropartikeln nicht freigesetzt wurde und es darauf zurück zu führen war, dass der Wassergehalt im Laufe der Lagerung zugenommen hat

und es zu Aggregation führte [Crotts et al., 1998]. Da tendenziell die Restfeuchte der Formulierungen dieser Studie ebenfalls zunimmt, ist die in-vitro Freisetzung der Proteine besonders interessant und wird in der Zukunft weiter verfolgt werden.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Grundlagen für die Implementierung einer Plattformtechnologie zur Herstellung von parenteralen Depotarzneiformen für biologische Wirkstoffe. Die Basis des Depots stellte das biokompatibel und biologisch abbaubare Polymer PLGA dar. Die Arzneiform sollte die kontrollierte Freisetzung von Proteinen im Molekülgrößenbereich von 10 bis 150 kDa über Wochen oder Monate ermöglichen. Es wurden drei Modellproteine (Lysozym, BSA, IgG) ausgewählt, die den gewünschten Größenbereich abdeckten. Da es für die Produktion eines Depots mehrere Wege gab, wurde evaluiert, welche Form erfolgversprechend erschien und mit den gegebenen Möglichkeiten produzierbar war. Die Depotform wurde auf Mikropartikel festgelegt, da die Herstellung mit gängiger Laborausrüstung möglich und das resultierende Pulver gut zu dosieren war. Ein weiterer Vorteil war die Aussicht auf subkutane Applikation des Depots, die idealerweise vom Patienten selbst durchgeführt werden könnte.

Die Herstellung der Mikropartikel erfolgte über das Lösungsmittelverdampfungsverfahren. Es handelte sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem eine wässrige Proteinlösung mit einer organischen Polymerphase homogenisiert wurde. Die Emulsion wurde in eine weitere, wässrige Phase gegeben, die einen Stabilisator zur Vermeidung von Koaleszenz der Polymertröpfchen enthielt. Durch Verdampfung des organischen Lösungsmittels härteten die Tröpfchen zu Partikeln aus. Da die Wirkstoffphase zuvor homogen in der Polymerphase verteilt wurde, war der Wirkstoff nun in die Matrix der Mikropartikel eingebettet. Nach Gewinnung und Aufreinigung der Mikropartikel erfolgte Lyophilisation, um ein trockenes Pulver zu erhalten. Bei der Entwicklung des Herstellprozesses mussten viele Einflussgrößen beachtet werden. Das Verhältnis der einzelnen Phasen zueinander beeinflusste deutlich die Partikelbeschaffenheit. Anfangs wurden sehr poröse Partikel produziert, die kaum Protein enthielten. Durch Volumenreduktion der Proteinlösung und Erhöhung der Polymermasse wurden kompakte Mikropartikel erschaffen, die durchschnittlich 6% Protein enthielten.

Da PLGA in vielen verschiedenen Varianten auf dem Markt ist, wurde zur Eingrenzung der Vielfalt ein Polymerscreening durchgeführt. Die Auswahl wurde auf PLGA-Typen mit einem Lactid/Glykolid-Verhältnis von 50/50 beschränkt. Neben den gängigen PLGA-Monoblockvarianten wurden auch Di- und Triblockcopolymere aus PLGA und Polyethylenglykol eingesetzt. Es wurden verschiedene Mikropartikel-Formulierungen unter gleichen Prozessbedingungen hergestellt, die nur in ihrer Polymermatrix variierten. Um den Einfluss von PEG auf die Mikropartikeleigenschaften und die in-vitro Freisetzung des Proteins zu untersuchen, wurden zusätzlich physikalische Mischungen aus PLGA und PEG hergestellt und als Polymergrundlage eingesetzt. Die Analytik ergab, dass Unterschiede in der Partikelgröße, der Morphologie und der spezifischen Oberfläche der verschiedenen Formulierungen vorhanden waren. Die amphiphilen Eigenschaften des Polyethylenglykols führten dazu, dass sich das Protein homogener in den Partikeln verteilte. Jedoch führte der PEG-Anteil in physikalischen Mischungen oder Diblockcopolymeren bei der in-vitro Freisetzung von BSA aus Mikropartikeln zu einer hohen initialen Freisetzung, so dass innerhalb einer Woche alles freigesetzt war. Der Freisetzungsverlauf von Protein aus Partikeln basierend auf Monoblockpolymeren verlief nach bekanntem Muster. Anfangs wurden ca. 30% Protein freigesetzt, gefolgt von einer lag-Phase, in der keine Freisetzung stattfand. Nach sieben oder acht Wochen setzte der late burst ein, der weiteres Protein freisetzte. Die Freisetzung von BSA aus der Triblockcopolymer-Formulierung verlief hingegen langsam und kontinuierlich. Aufgrund seines Freisetzungsverhaltens wurde das Triblockcopolymer als sehr geeignet für Depotformulierungen eingestuft und bevorzugt in den weiteren Versuchen eingesetzt.

Da eine subkutane Applikation der Darreichungsform angestrebt wurde, stand die Partikelgröße im Fokus weiterer Untersuchungen. Die verwendeten Kanülen bei subkutaner Verabreichung haben eine Größe von 25 bis 27 G, was ungefähr einem Innendurchmesser von mindestens 216  $\mu\text{m}$  entspricht. Angestrebt wurden daher Mikropartikel, die einen  $D_{90}$  deutlich unter 200  $\mu\text{m}$  hatten, damit Kanülen während der Applikation von Mikropartikel-Suspensionen nicht verstopfen.

Im Zuge der Prozessoptimierung wurde neben dem Ultraturrax zur Homogenisierung der wässrigen und der organischen Phase auch Ultraschall eingesetzt und die Auswirkungen auf die Partikeleigenschaften untersucht. Durch Erhöhung der Stabilisator-Konzentration in der äußeren Phase um das zehnfache konnte die Partikelgröße der Mikropartikel drastisch von 126 µm auf 40 µm im Mittel reduziert werden. Zusätzlich konnte die Partikelgröße durch eine höhere Rührgeschwindigkeit der Doppelemulsion gesenkt werden. Die Anwendung von Ultraschall zur Herstellung der Primäremulsion führte zu einer sehr feinen Porenverteilung im Inneren der Mikropartikel und zu einem veränderten Freisetzungverhalten gegenüber Mikropartikeln, die mittels Ultraturrax hergestellt wurden. Während die initiale Freisetzung nur geringfügig beeinflusst wurde, zeigte sich eine Verzögerung des late burst um zwei Wochen gefolgt von einer kontinuierlichen Freisetzung des Proteins aus den Mikropartikeln. Aus der Optimierung resultierte ein Standardprozess für die Mikropartikelfertigung, der zur Herstellung der Primäremulsion Ultraschall nutzte.

Ursprünglich wurden Mikropartikel mit Polyvinylalkohol als Stabilisator in der äußeren Phase hergestellt. Zwar wurden die Mikropartikel gewaschen, jedoch adsorbierte ein Teil des Stabilisators am Partikel. Da PVA in vivo in höheren Konzentrationen Anämie auslöste und diverse Organe infiltrierte, wurde nach einer Alternative gesucht. In einer Studie wurden verschiedene Hilfsstoffe als Stabilisatoren der äußeren Phase untersucht. Mikropartikel, die mit Natrium-Desoxycholat, Polysorbat 20 oder mit Natrium-Carboxymethylcellulose in der äußeren Phase hergestellt wurden, waren porös und zeigten in der in-vitro Freisetzung einen sehr hohen initial burst, so dass innerhalb von einer Woche das gesamte verkapselte Protein freigesetzt war. Große Ähnlichkeit in der Partikelmorphologie und in der in-vitro Freisetzung hatten Partikel, die mit Methylcellulose stabilisiert wurden, mit Mikropartikeln, die PVA in der äußeren Phase enthielten.

Da sich Methylcellulose als Stabilisator in der äußeren Phase für die Herstellung von Mikropartikeln eignete, wurden in einer statistischen Versuchsplanung verschiedene Prozessparameter und ihr Einfluss auf die Partikeleigenschaften evalu-

iert. Die Rührgeschwindigkeit der Doppelemulsion und die Konzentration der Methylcellulose in der äußeren Phase hatten großen Einfluss auf die Mikropartikeleigenschaften. Schnelles Rühren bei 1500 U/min führte zu kleinen Partikeln, ebenso wie der Einsatz einer hohen Methylcellulose-Konzentration (5%). Durch Kombination beider Parameter entstanden Partikel, die im Mittel 15 µm groß waren. Eine hohe Methylcellulose-Konzentration führte zu einer Verkapselungsrate von durchschnittlich 78%, wohingegen Partikel, die mit weniger MC (0,5% oder 2,75%) in der äußeren Phase hergestellt wurden, eine Verkapselungsrate von 90% erreichten. Zu Lasten der hohen Methylcellulose-Konzentration ging die Ausbeute, die in jenen Fällen 58% betrug. Die Ausbeute aller übrigen Formulierungen lag im Mittel bei 71%. Durch die Höhe der MC-Konzentration wurde das Freisetzungsverhalten beeinflusst. Mikropartikel, die mit geringer MC-Konzentration hergestellt wurden, zeigten keinen initial burst. Bei mittlerer MC-Konzentration betrug die initiale Freisetzung von BSA ca. 30%, und bei hoher Stabilisatorkonzentration waren innerhalb der ersten 24 h bereits 80% Protein freigesetzt.

Schließlich war die mittlere MC-Konzentration die geeignetste Variante der äußeren Phase, da sie Partikel mit befriedigenden Eigenschaften hervorbrachte. Eine niedrige MC-Konzentration führte zu recht großen Partikeln. Mikropartikel, die mit hoher MC-Konzentration hergestellt wurden, verfügten über eine schlechte Ausbeute und eine geringe Verkapselungsrate des Proteins.

Aufgrund der statistischen Versuchsplanung resultierte eine Stammrezeptur, die aus einer Ultraschallamplitude von 35% (70 W), sowie einer Rührgeschwindigkeit der Doppelemulsion von 1000 U/min und einer Methylcellulose-Konzentration von 2,75% in der äußeren Phase bestand. Durch den Einsatz von Sorbitol in der äußeren Phase als osmotisch aktives Agens wurde die Verkapselungsrate des Proteins verbessert. Die in-vitro Freisetzung verlief ohne initial burst und die kontinuierliche Freisetzung setzte in Abhängigkeit des Proteins nach vier Wochen oder nach sechs Wochen ein.

Nachdem der Herstellprozess für die Mikropartikelproduktion im Labormaßstab ausgereift war und viele verschiedene Formulierungen hinsichtlich Reproduzierbarkeit getestet worden waren, wurde der Prozess in den technischen Maßstab übertragen. Der zur Verfügung stehende Laborreaktor bestand aus einem konisch zulaufenden, doppelwandigen Glasgefäß, einem Ankerrührer mit einer Maximalleistung von 200 U/min und einem Homogenisiergerät. Nach einigen Versuchen waren die Prozessbedingungen für die Apparatur ermittelt, die Mikropartikel in ähnlicher Größe und Porosität wie im Labormaßstab hervorbrachten. Die dreimalige Herstellung einer ausgewählten Formulierung im technischen Maßstab gab Auskunft über die Reproduzierbarkeit. Alle drei Chargen stimmten in Ausbeute, Partikelgröße und Verkapselungsrate überein, lediglich die innere Morphologie der Partikel wies Unterschiede in der Porengröße auf, was die in-vitro Freisetzung geringfügig beeinflusste. Im technischen Maßstab ließen sich unter gleichen Bedingungen mehrfach Mikropartikel einheitlicher Chargenbeschaffenheit herstellen. Die Reproduzierbarkeit des Prozesses war gegeben.

Da die Herstellung von Mikropartikeln im technischen Maßstab größere Mengen Material erfordert, ist es sinnvoll, die Formulierungsentwicklung im Labormaßstab durchzuführen und den Prozess anschließend zu skalieren. Um das zu ermöglichen, war es notwendig, die Vergleichbarkeit beider Ansätze zu untersuchen. Es wurden drei Chargen einer Formulierung im Labormaßstab und eine Charge der gleichen Formulierung im technischen Maßstab hergestellt. Die Ausbeute der Mikropartikel des technischen Maßstabs war höher als die der Mikropartikel des Labormaßstabs, da Entnahme der Mikropartikel-Suspension und Reinigung des Reaktionsgefäßes vereinfacht war. Hinsichtlich Partikelgröße und Verkapselungsrate harmonisierten beide Ansätze, dagegen waren in der inneren Morphologie Unterschiede festzustellen. Partikel des technischen Maßstabs waren viel grobporiger als Mikropartikel des Labormaßstabs resultierend in einem höheren initial burst und einer um eine Woche schnelleren in-vitro Freisetzung des Proteins. Vermutlich war die Verdampfung des Lösungsmittels im geschlossenen System des technischen Maßstabs zu langsam, so dass Emulsionströpfchen koaleszierten und große Poren zurückblieben. Eine Beschleunigung der Verdamp-

pfungsrate durch das Einleiten von Stickstoff oder durch das Evakuieren der Rührapparatur könnte Auswirkungen auf die innere Morphologie haben. Wahrscheinlich war die Verdampfungsrate beeinflussbar durch die Zusammensetzung der äußeren Phase, denn es wurde beobachtet, dass es bei Formulierungen, die zusätzlich 16% Sorbitol in der äußeren Phase enthielten, keine Unterschiede zwischen beiden Ansätzen gab. In anknüpfenden Experimenten sollte der Einfluss auf Innenstruktur der Partikel und in-vitro Freisetzung des Proteins durch Veränderungen der Verdampfungsrate und der äußeren Phase weiter untersucht werden.

Im letzten Teilbereich dieser Arbeit wurde eine Langzeit-Lagerstabilität verschiedener Mikropartikel-Formulierungen bei unterschiedlichen Klimabedingungen durchgeführt. Es wurden drei Formulierungen, die sich lediglich im verkapselten Protein unterschieden, bei 5 °C und bei 25 °C/60% rF über zwölf Monate eingelagert. Bei Abschluss dieser Arbeit konnten erst Aussagen über die Lagerstabilität der Formulierungen über einen Monat getroffen werden. Im Laufe der Lagerung blieben alle Formulierungen hinsichtlich Morphologie, Partikelgröße und Verkapselungsrate stabil. Innerhalb eines Monats verdoppelte sich der Wassergehalt bei allen Formulierungen auf 0,8%. Außerdem veränderte sich die Glasübergangstemperatur um 1 bis 2 °C, was auf Polymeralterung oder Wasserabsorption zurückzuführen war. In der in-vitro Freisetzung der Proteine aller Formulierungen wurden bis zu diesem Zeitpunkt keine Veränderungen festgestellt. Die Lagerstabilität sollte über ein Jahr lang verfolgt werden, um Erfahrungen über die Stabilität von verkapselten Proteinen in PLGA-Mikropartikeln zu sammeln sowie ferner Erkenntnisse über geeignete Lagerbedingungen für Mikropartikelformulierungen und Haltbarkeiten zu erlangen.

Durch die Wahl und Konzentration der äußeren Phase ließen sich Partikeleigenschaften wie Partikelgröße und Verkapselungsrate beeinflussen. Von großer Bedeutung war der Einfluss auf die in-vitro Freisetzung des Proteins, die sich besonders durch Methylcellulose in der äußeren Phase steuern ließ. In fortführenden Untersuchungen ist die in-vivo Freisetzung des Antikörpers aus den Mikro-

partikeln oder anderer in-vivo nachweisbarer Proteine von großem Interesse. Es stellt sich die Frage, ob eine in-vitro/in-vivo Korrelation möglich ist.

Die Herstellung von PLGA-Mikropartikeln als eine Form parenteral zu applizierender Depotarzneiformen ist im Labormaßstab und im technischen Maßstab mit reproduzierbaren Ergebnissen möglich. Die Beladung der Mikropartikel mit verschiedenen Modellproteinen stellvertretend für unterschiedliche Proteinklassen war unkompliziert, da die Proteine während der Herstellung und der in-vitro Freisetzung stabil blieben. Die Herstellung von Mikropartikeln mit dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Basisprozess sollte auf andere, therapeutisch anwendbare Proteine übertragbar sein. Durch die Verkapselung von Modellproteinen, die sich deutlich in ihrem Molekulargewicht und anderen physikochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden, konnte gezeigt werden, dass die Molekülgröße des Proteins mit der Größe resultierender Mikropartikel und der in-vitro Freisetzung des verkapselten Proteins korrelierte. Die Mikroverkapselung von großen Proteinen wie Antikörpern führt zu größeren Mikropartikeln, aus denen das Protein später freigesetzt wird als bei Mikropartikeln, die mit kleineren Proteinen beladen sind.

Der Herstellprozess setzt voraus, dass die zu verkapselnden Proteine gegenüber Scherbeanspruchung stabil bleiben. Es empfiehlt sich, gerade bei sehr empfindlichen Proteinen, zuerst eine stabile Flüssigformulierung zu entwickeln, die anschließend für die Mikroverkapselung verwendet wird. Der Einsatz von Proteinen im festen Zustand ist ebenfalls möglich. Im sogenannten einfachen Emulsionsverfahren wird das Proteinpulver direkt in der Polymerlösung suspendiert. Dieses Verfahren wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und die dabei auftretenden möglichen Fragestellungen nicht evaluiert. Bei der Verwendung von lyophilisiertem Protein ist ferner zu beachten, dass die Formulierung Hilfsstoffe enthält, die ggf. die in-vitro Freisetzung beschleunigen können. Der Anteil an Hilfsstoffen sollte daher in einer Lyo-Formulierung, die für die Mikroverkapselung eingesetzt wird, sehr gering sein.

Ein nicht unerheblicher Aspekt bei der Mikroverkapselung ist die Beladung. Mikropartikel können mit mehr als 10% Wirkstoff beladen werden, jedoch resultiert es häufig in einem Wirkstoffverlust, so dass Verkapselungsraten von 50 oder 60% erreicht werden. Es erfordert einen erhöhten Formulierungsaufwand, um hohe Partikelbeladungen zu erzielen. Die Rückgewinnung des nicht-verkapselten Wirkstoffs ist aufwendig und kann zu Schädigungen des Proteins führen, so dass die Mikroverkapselung sehr kostspielig wird. Außerdem ist zu bedenken, dass die Mikropartikel vor der Applikation z.B. in einer Flüssigkeit wie WFI suspendiert werden und dass subkutan maximal 1 mL verabreicht werden kann. Aus diesen Gründen eignen sich hauptsächlich hochpotente biologische Wirkstoffe für die Mikroverkapselung.

Die in-vitro Freisetzung von Proteinen aus Mikropartikeln wird von vielen Faktoren beeinflusst. Der im Herstellprozess verwendete Hilfsstoff zur Stabilisierung der nativen Mikropartikel kann je nach Konzentration zu einer schnellen oder zu einer verzögerten Freisetzung führen. Ferner bedingt ein zu hoch gewählter Energieeintrag bei der Herstellung der Primäremulsion ein schnelles Freisetzungsverhalten des verkapselten Proteins. Die Beimischung von PEG zur Polymerlösung kann die Freisetzung ebenfalls beschleunigen. Entscheidenden Einfluss auf die in-vitro Freisetzung hat jedoch die Auswahl des Polymers, da seine Degradationskinetik maßgebend für die Freisetzung des Wirkstoffs ist. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit einem Triblockcopolymer gearbeitet, dass aus zwei Teilen PLGA und einem Teil PEG aufgebaut ist. Die unter gleichen Bedingungen hergestellten Mikropartikel setzten die verschiedenen Proteine auf die gleiche Weise frei, wobei die Freisetzung des Antikörpers bedingt durch das Molekulargewicht eine Woche später einsetzte als die Freisetzung der anderen beiden, kleineren Proteine. Es ist wahrscheinlich, dass die unter gleichen Bedingungen durchgeführte Mikroverkapselung eines anderen therapeutischen Proteins zum gleichen Freisetzungsprofil führen wird. Daher ist es empfehlenswert, die Entwicklung einer Mikropartikelformulierung mit gewünschtem Freisetzungsprofil zuerst mit einem Modellprotein durchzuführen, um den Prozess anschließend auf das therapeutisch wirksame Protein zu übertragen.



## 6 ANHANG

### 6.1 Geräte

Analysenwaage:	AT261 Delta Range Mettler Toledo GmbH, 8606 Greifensee, Schweiz
DSC:	DSC 821 mit Flüssigstickstoffkühlung Mettler Toledo, 35353 Gießen, Deutschland
Elektrophoreseapparatur:	Invitrogen PowerEase 500 Power Supply Life Technologies GmbH, 64293 Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresekommer:	Invitrogen Xcell SureLock, Mini-Cell Life Technologies GmbH, 64293 Darmstadt, Deutschland
Flügelrührer:	Eurostar digital IKA, 79219 Staufen, Deutschland
Freisetzungssapparatur:	CE 7 smart Sotax AG, 4123 Allschwil, Schweiz
Gefrierschrank:	Hera freeze – 70 °C Heraeus, 63450 Hanau, Deutschland
Gefriertrockner Christ:	ALPHA 1-2 LD Martin Christ GmbH, 37520 Osterode am Harz, Deutschland

Gefriertrockner Tiny:	Lyo Com 4018 (Tiny Lyo) Hof GmbH, 35102 Lohra, Deutschland
Heizblock:	Grant Instruments Ltd, Cambridgeshire, Großbritannien
Horizontalschüttler:	Kombischüttler KL 2 Edmund Bühler GmbH, 72379 Hechingen, Deutschland
KF-Coulometer:	Typ 756 Metrohm AG, 9100 Herisau, Schweiz
Konfokalmikroskop:	Eclipse Ti Al Laser Scanning Confocal Imaging System Nikon, 40472 Düsseldorf, Deutschland
Laborreaktor:	ESCO-Vakuummischanlage Typ EL1pm ESCO-Labor AG, 4125 Riehen, Schweiz
Laserdiffraktion:	Helos Sucell Sympatec, 38678 Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Magnetrührplatte:	RT 10 power IKAMAG® IKA, 79219 Staufen, Deutschland
Mikroplatten-UV-Meter:	Power Wave XS BioTek Instruments, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland

Minishaker:	MS2 Minishaker IKA, 79219 Staufen, Deutschland
Oberflächenbestimmung:	Autosorb-3-Kr Quantachrome GmbH, 85235 Odelzhausen, Deutschland
Oberschalenwaage:	MC1 Laboratory LC2200 S Sartorius AG, 37075 Göttingen, Deutschland
Osmometer:	Osmomat 030 Gonotec GmbH, 10553 Berlin, Deutschland
pH-Meter:	pH 340 WTW GmbH, 82362 Weilheim, Deutschland
Pipettierautomat:	Precision 2000 BioTek Instruments, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop:	Tescan Vega II SHB Tescan, Brno, Tschechische Republik
Sputtergerät:	Cressington 108auto/SE Cool Sputter Coater Cressington Scientific Instruments, Watford, Großbritannien
Turbulamischer:	WAB Turbula Typ T2F Willy A. Bachofen AG, 4005 Basel, Schweiz

Ultraschallsonde:	UP200S Hielscher, 14513 Teltow, Deutschland
Ultraturrax:	T18 basic IKA, 79219 Staufen, Deutschland
Vakuumschrank:	APT-Line VDL 115 Binder GmbH, 78532 Tuttlingen, Deutschland
Viskosimeter:	HAAKE Rheostress 600 ThermoScientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland
Wasserbad:	Modell 1086 GFL, 30938 Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge:	Biofuge Primo R Heraeus, 63450 Hanau, Deutschland

## 6.2 Substanzen

BCA-Assay:	BCA Reagent A Art.Nr. 23223; #NC168076  BCA Reagent B Art.Nr. 23224; #NB166746 Thermo Scientific, 53113 Bonn, Deutschland
BSA:	Bovines Serumalbumin BI-Art.Nr. 23517; BI-#1056666 Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Cholat:	Natrium-Desoxycholat Art.Nr. 30970-100G; #BCBF4834V Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland
CMC-Na:	Carboxymethylcellulose-Natrium, geringe Viskosität Art.Nr. C5678; #117K0133 Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Dichlormethan:	Art.Nr. 1.06044.2500; #K40974644 016 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
DTT:	1,4-Dithiothreitol Art.Nr. 04010; #3051 Biomol GmbH, 22769 Hamburg, Deutschland
EDTA:	Natrium-Edetat Dihydrat BI-Art.Nr. 23902; #705473 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
FITC-BSA:	Fluoresceinisothiocyanat-markiertes BSA Art.Nr. A9771-1G, #047K7455 Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland

HCl:	Salzsäure, 1 N Art.Nr. K025.1; #062182855 Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Glycerol:	Emprove® Art.Nr. 1.04091.1000; #Z223591 105 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
KCl:	Kaliumchlorid BI-Art.Nr. 23911, BI-#601874 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Kaliumdihydrogenphosphat Art.Nr. 1.04873.1000, #A850773 723 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
Lysozym:	Lysozym-Chlorhydrat Art.Nr. F000LY016; #22925 Labso Chimie fine, 33291 Blanquefort Ced, Frankreich
MC 15:	Methocel A15 LV BI-Art.Nr. 50641; #101140 Dow Chemicals, Michigan 48674, USA
MC 4000:	Methylcellulose 4000 Art.Nr. M0512; #066K0129 Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland
MES:	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat Art.Nr. 1.06126.0250; #K40323626 932 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> :	Art.Nr. M3770-5G; #111M8601V Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland

MOPS:	3-Morpholinopropansulfonsäure Art.Nr. 6979.4; #16996337 Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
NaCl:	Natriumchlorid BI-Art.Nr. 41781, BI-#106409 Akzo Nobel GmbH, 52355 Düren, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	Dinatriumhydrogenphosphat, Calbiochem Art.Nr. 567550, #D00090482 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
NaOH:	Natriumhydroxid-Plättchen BI-Art.Nr. 977; BI-#003560 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
PEG 6000:	Polyethylenglykol 6000 Art.Nr. 0158; #160154690 Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Polymere:	Resomer RG 504                      Art.Nr. 60640662; #1037453 Resomer RG 504H                      Art.Nr. 60640803; #1039049 Resomer RG 505                      Art.Nr. 60640663; #1038610 Resomer RGP d 50105                      Art.Nr. 69140; #1037099 Resomer RGP d 50155                      Art.Nr. 69141; #1036852 Resomer RGP t 50106                      Art.Nr. 69152 ; #1043255 Evonik Industries, 45128 Essen, Deutschland
Polysorbat 20:	Tween 20 BI-Art.Nr. 39381, #807923 Croda International Plc, East Yorkshire, Großbritannien
Polysorbat 80:	Tween 80 BI-Art.Nr. 62926; #100173 Croda International Plc, East Yorkshire, Großbritannien

PVA:	Mowiol® 4-88 Art.Nr. 0713; #511174456, # 240156677, #299108011 Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
SDS:	Natriumdodecylsulfat Art.Nr. 20765; #091069 SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg, Deutschland
ServaBlue G250:	Art.Nr. 35050; #090147 SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg, Deutschland
Sorbitol:	BI-Art.Nr. 65484; BI-#002784 Roquette GmbH, 60598 Frankfurt, Deutschland
TRIS-Base:	Tromethamol BI-Art.Nr. 23627; BI-#106188 Angus Chemie GmbH, 49479 Ibbenbüren, Deutschland
TRIS-HCl:	Tromethamol-HCl BI-Art.Nr. 26180; BI-#005880 und #004543 Angus Chemie GmbH, 49479 Ibbenbüren, Deutschland



## 6.3 Puffer

### Freisetzungspuffer I (67 mM; pH 7,4):

Substanz	Konzentration [g/L]
Kaliumdihydrogenphosphat	1,65
Dinatriumhydrogenphosphat	7,75

### Freisetzungspuffer II (400 mM; pH 7,4):

Substanz	Konzentration [g/L]
Kaliumdihydrogenphosphat	9,9
Dinatriumhydrogenphosphat	46,3
Polysorbat 20	0,2

### MES Laufpuffer pH 7,3 (SDS-PAGE):

Substanz	Konzentration [g/L]
MES	9,76
Tris Base	6,06
SDS	1
EDTA	0,3

### MOPS Laufpuffer pH 7,7 (SDS-PAGE):

Substanz	Konzentration [g/L]
MOPS	10,46
Tris Base	6,06
SDS	1
EDTA	0,3

NuPage LDS Probenpuffer (SDS-PAGE):

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
Tris HCl	83,25
Tris Base	85,25
SDS	100
EDTA	0,75
Glycerol	500
ServaBlue G250	94 mL
Phenolrot	31 mL

67 mM Phosphatpuffer pH 7,4:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,652
Dinatriumhydrogenphosphat	7,75

67 mM Phosphatpuffer pH 6,2:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
NaCl	8
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	1,43
Kaliumhydrogenphosphat	0,2
Kaliumchlorid	0,2

## 6.4 Materialien

Bördelkappen:	Caps; seal 13 mm long; white flip off Art.Nr. 2112700, #000A071925
DSC-Tiegel:	Aluminium-Standardtiegel 40 µL Art.Nr. ME-26763  Deckel Art.Nr. 1/5 ME-51119873 Mettler-Toledo, 8606 Greifensee, Schweiz
PP-Röhrchen:	BD Falcon, 50 mL Art.Nr. 352070 Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
Filter:	Durapore® Membranfilter PVDF Art.Nr. HVLP04700  Millex®- HV <sub>4</sub> Art.Nr. SLHVR04NL Millipore, 65824 Schwalbach, Deutschland  Glasfaserrundfilter GF/D, F100-0200, 25 mm Art.Nr. 1823-025  Glasfaserrundfilter GF/F, F100-0110, 15 mm Art.Nr. 1825-015 Whatman GmbH, 37586 Dassel, Deutschland
Gel:	NuPAGE 12% Bis-Tris-Gel Art.Nr. NP0343BOX; #11092271 Life Technologies GmbH, 64293 Darmstadt, Deutschland

Glasvials:	6 mL, farblos, Fiolax Art.Nr. 1096725; #6101677776  10 mL, farblos, Fiolax BI-Art.Nr. 42145; BI-#902435  20 mL, farblos, Fiolax Art.Nr. 1096723; #6102273313  50 mL, farblos, Fiolax Art.Nr. 1215720; #6102356178 Schott AG, 79379 Müllheim-Baden, Deutschland
Mikroplatte:	96-well, glasklar Art.Nr. 655101 Greiner bio-one, 72636 Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß:	Eppendorf-Reaktionsgefäß, Safe-Lock Tubes 1,5 mL Art.Nr.0030 120.086; #B146914I Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
REM-Zubehör:	Probenhalter aus Aluminium Art.Nr. G301 Agar Scientific Ltd., Essex, Großbritannien  Haftaufkleber (Leit-Tabs); 12 mm Art.Nr. 10782193; #G3347 Plano GmbH, 35578 Wetzlar, Deutschland
Spritzen:	Plastipak®, 1 mL B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
Stopfen:	Gummistopfen Art.Nr. S2-F451-RS D777-1; # 805041 West Pharmaceutical Services GmbH, 52249 Eschweiler, Deutschland

Zentrifugeneinheit: Amicon® Ultra, Ultracel 30 K, 15 mL  
Art.Nr. UFC903024; #R2AA76769  
Millipore, 65824 Schwalbach, Deutschland

## 6.5 Weitere Tabellen und Abbildungen

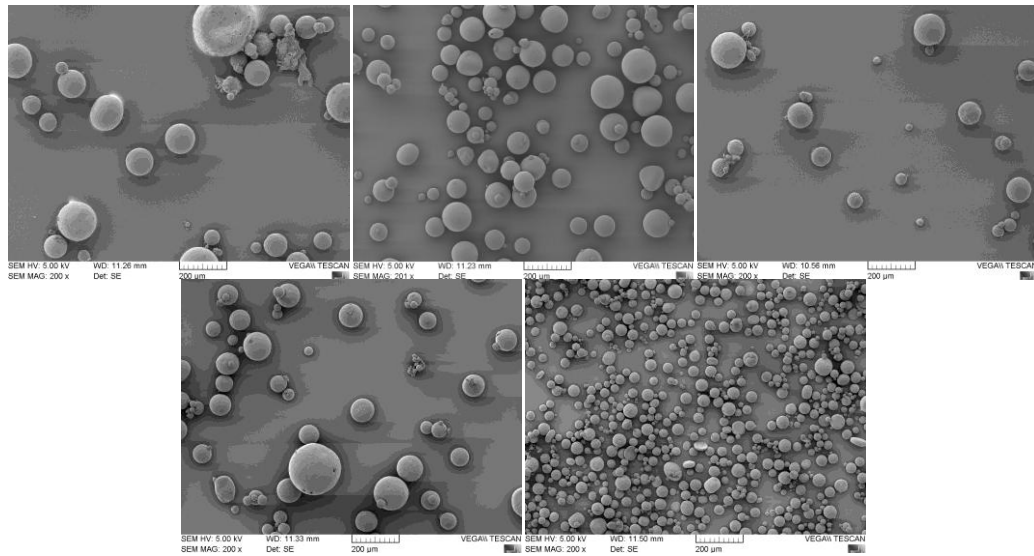


Abb. 6.1: REM-Aufnahmen der Formulierungen H1 bis H5 (v.l.n.r.)  
Übersicht bei 200 x

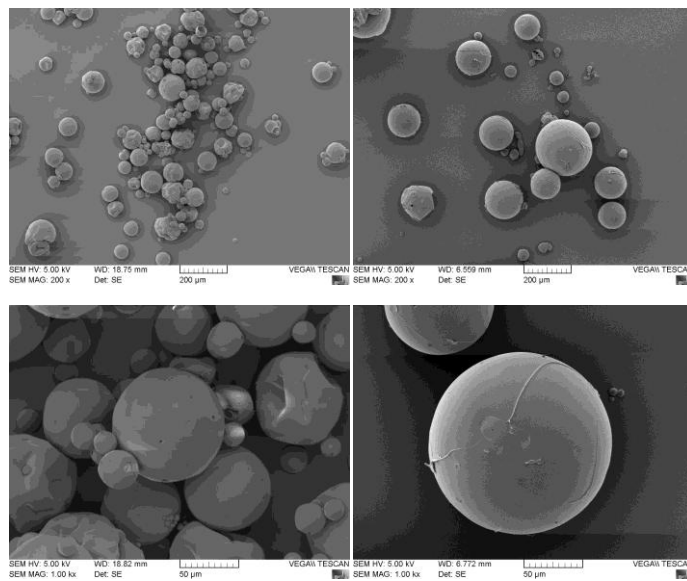


Abb. 6.2: Repräsentative REM-Aufnahmen der Formulierungen A1, A3  
(oben: Übersichtsaufnahme (200 x); unten: Detailansicht (1000 x))

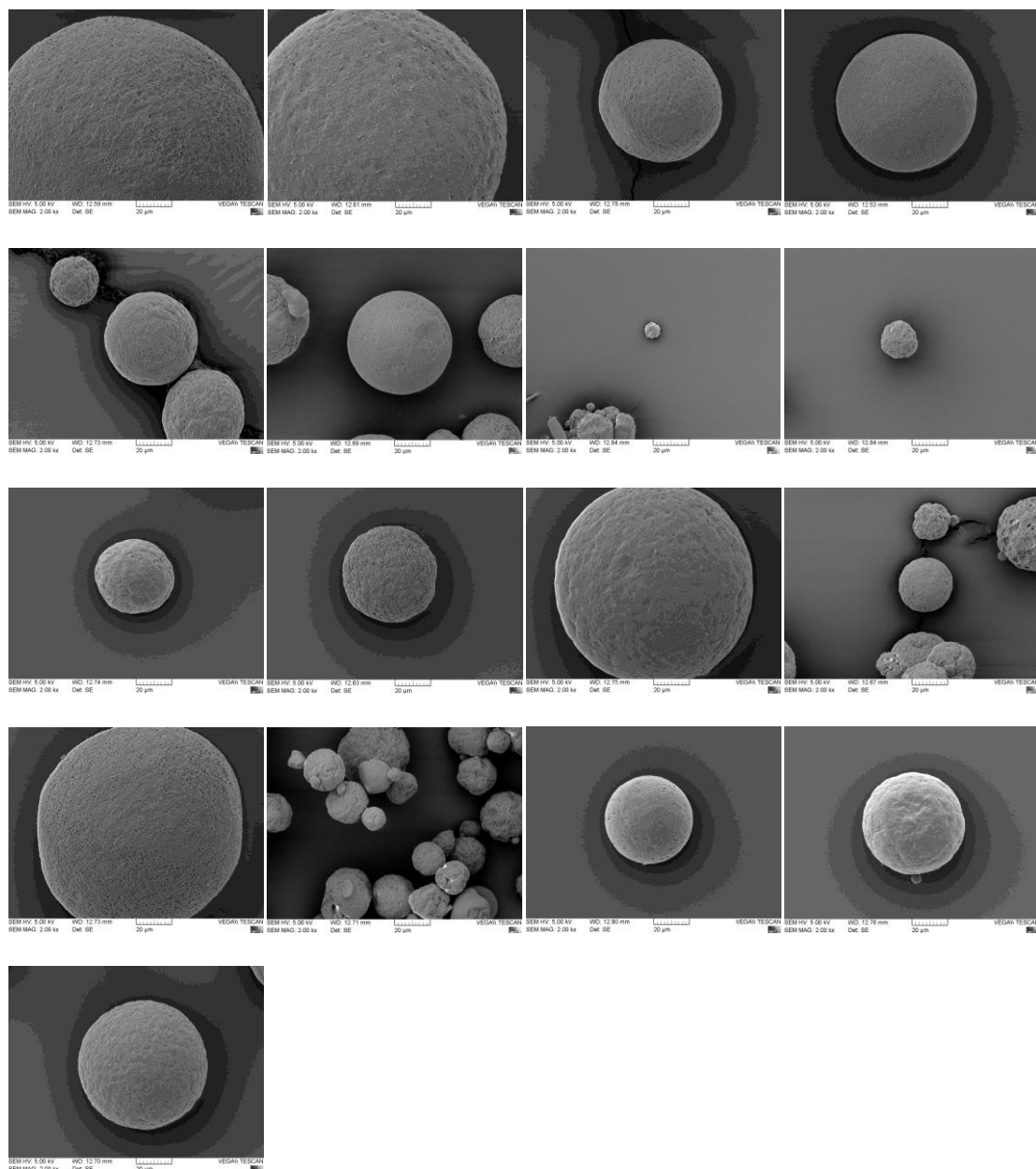


Abb. 6.3: REM-Aufnahmen aller Formulierungen N1 – N17 (v.l.n.r.) 2000 x

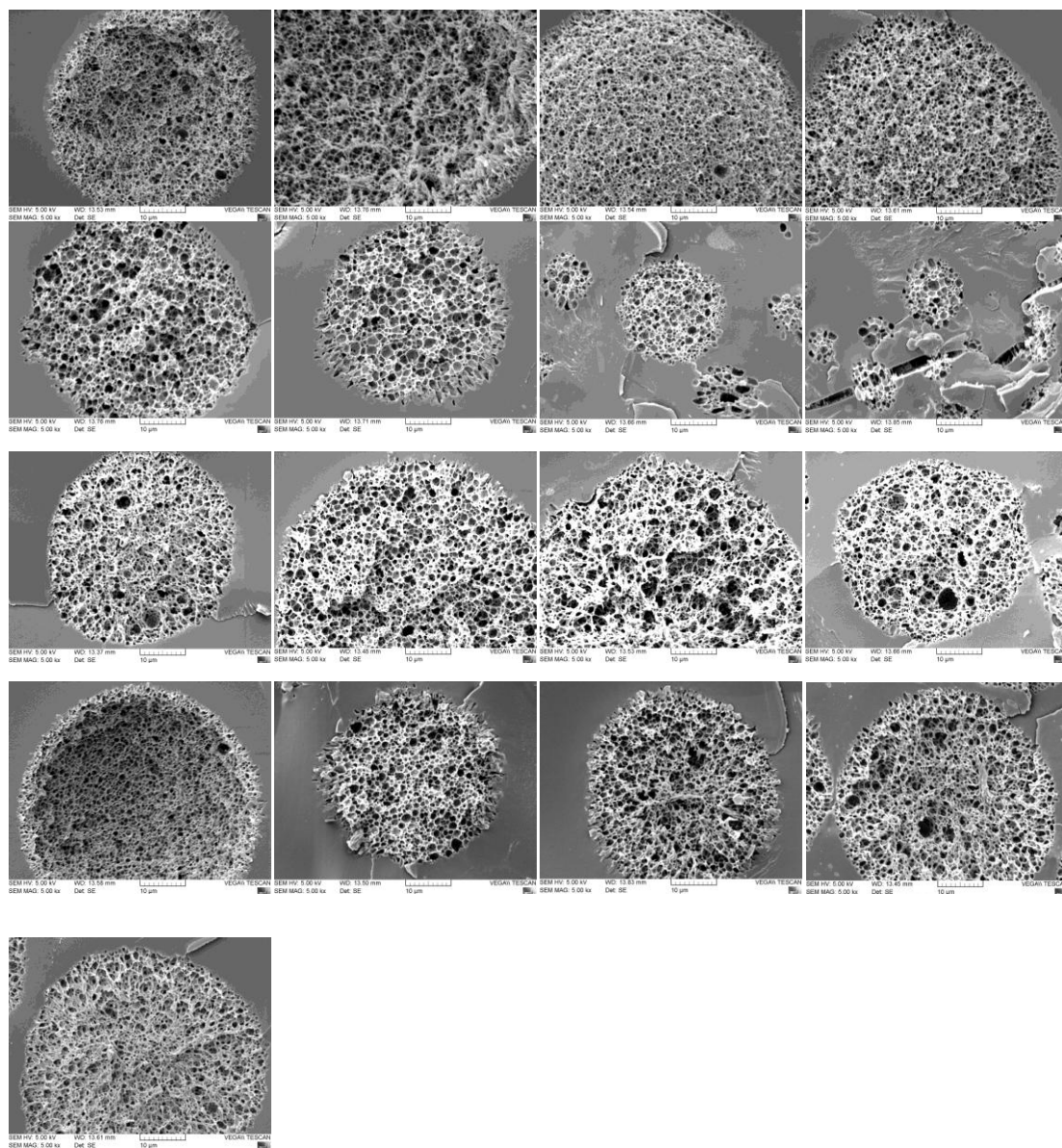


Abb. 6.4: REM-Aufnahmen der Querschnitte aller Formulierungen N1 – N17  
(v.l.n.r.) 5000 x



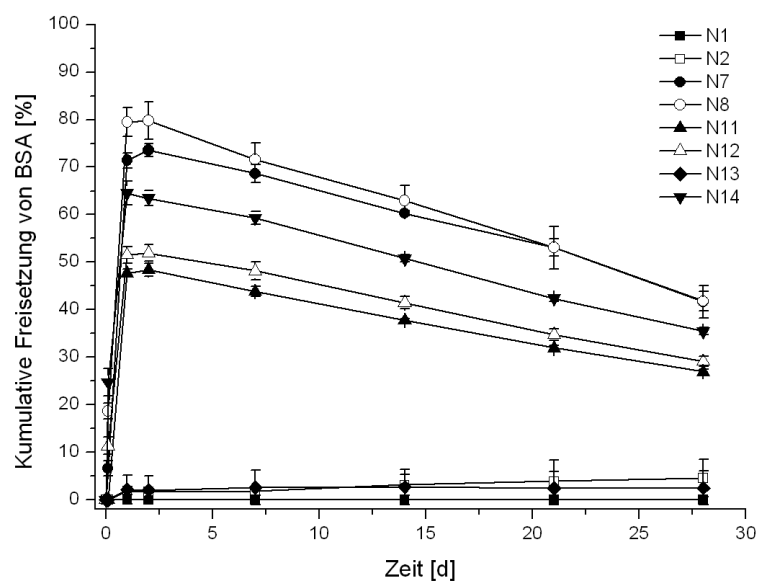


Abb. 6.5: In-vitro Freisetzung von BSA aus den übrigen Formulierungen der statistischen Versuchsplanung

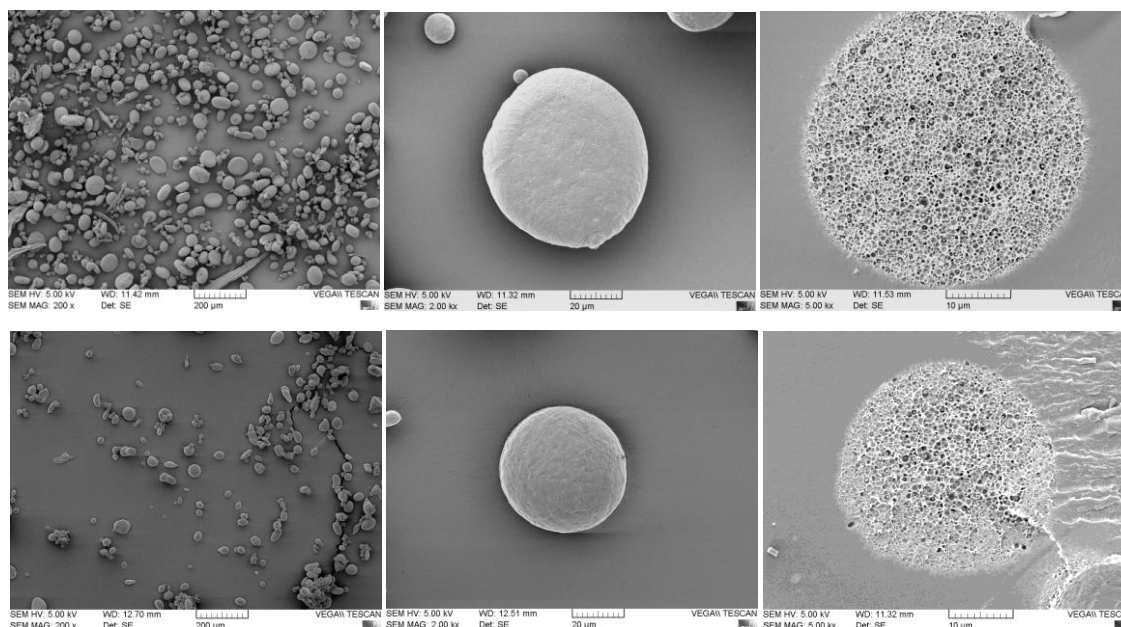


Abb. 6.6: REM-Aufnahmen von Formulierung LS-4 (oben) und LS-4k (unten)

Tab. 6.1: Lysozymaktivität

Formu- lierung	Protein	Sorbitol- anteil [%]	Aktivität nach 7 W Freisetzung [%]	Aktivität nach 14 W Freisetzung [%]	Abnahme der Aktivität [%]
<b>LS-0</b>	Lysozym	0	$110 \pm 12$	$92 \pm 11$	16
<b>LS-1k</b>	Lysozym	1	$106 \pm 11$	$85 \pm 2$	20
<b>LS-2k</b>	Lysozym	2	$115 \pm 21$	$82 \pm 6$	29
<b>LS-4</b>	Lysozym	4	$122 \pm 23$	$94 \pm 8$	23
<b>LS-4k</b>	Lysozym	4	$112 \pm 13$	$91 \pm 6$	19
<b>LS-8</b>	Lysozym	8	$117 \pm 15$	$90 \pm 5$	23
<b>LS-12</b>	Lysozym	12	$119 \pm 3$	$92 \pm 6$	22
<b>LS-16</b>	Lysozym	16	$121 \pm 6$	$93 \pm 4$	23
<b>LS-20</b>	Lysozym	20	$109 \pm 11$	$94 \pm 8$	14
<b>LS-20k</b>	Lysozym	20	$128 \pm 2$	$90 \pm 5$	29

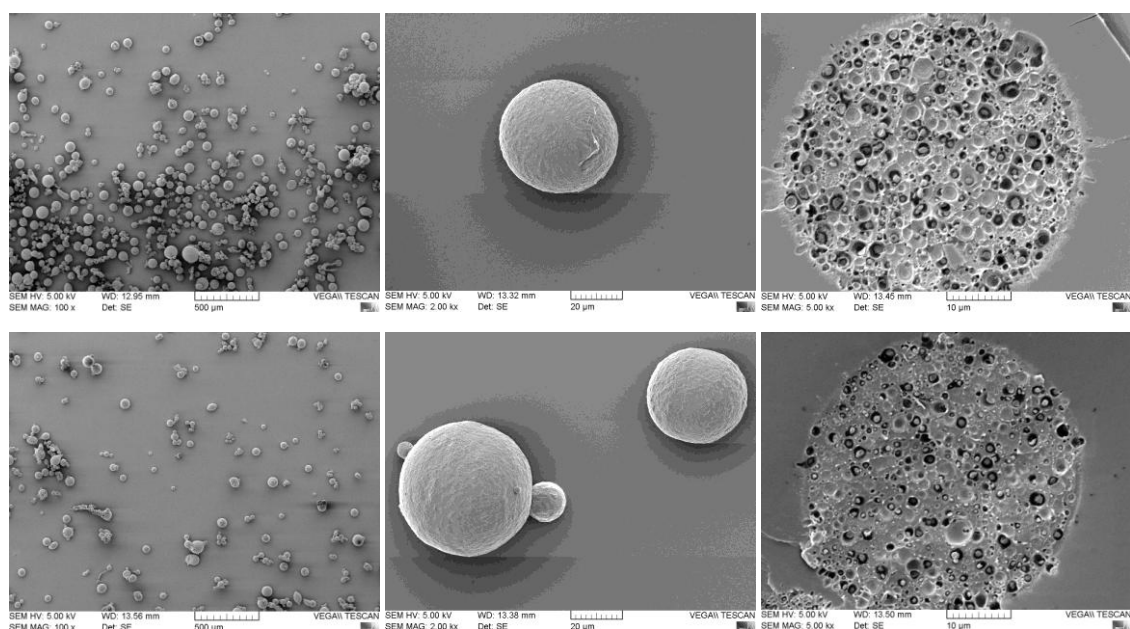


Abb. 6.7: REM-Aufnahmen von Formulierung L1 (nach 1 Monat gelagert bei 5 °C und 25 °C/60 % rF)

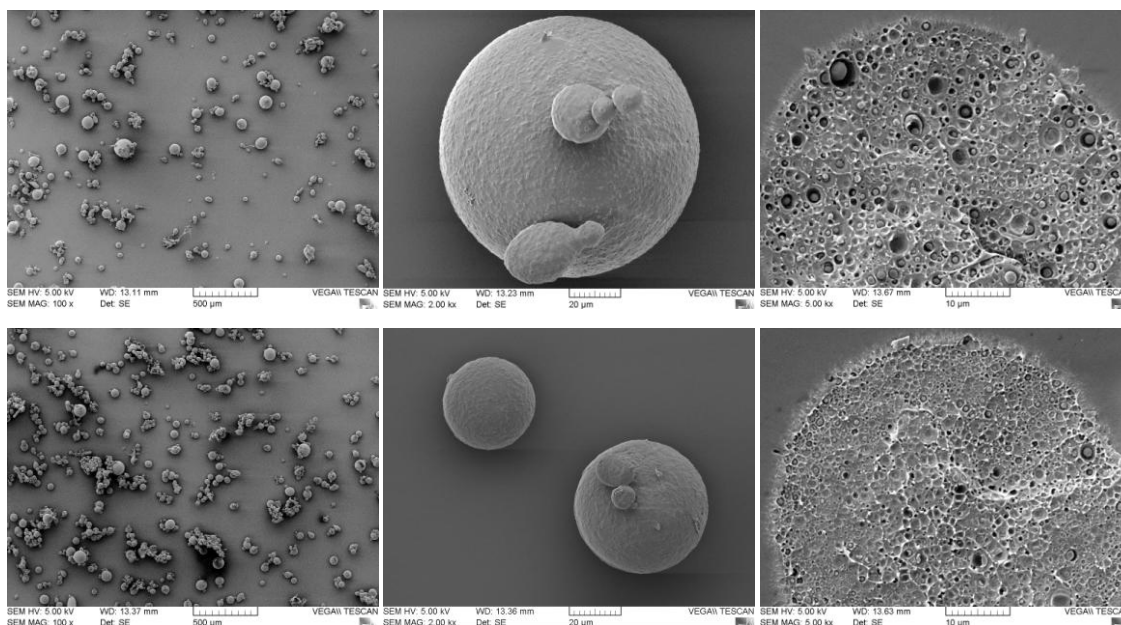


Abb. 6.8: REM-Aufnahmen von Formulierung L2 (nach 1 Monat gelagert bei 5 °C und 25 °C/60 % rF)

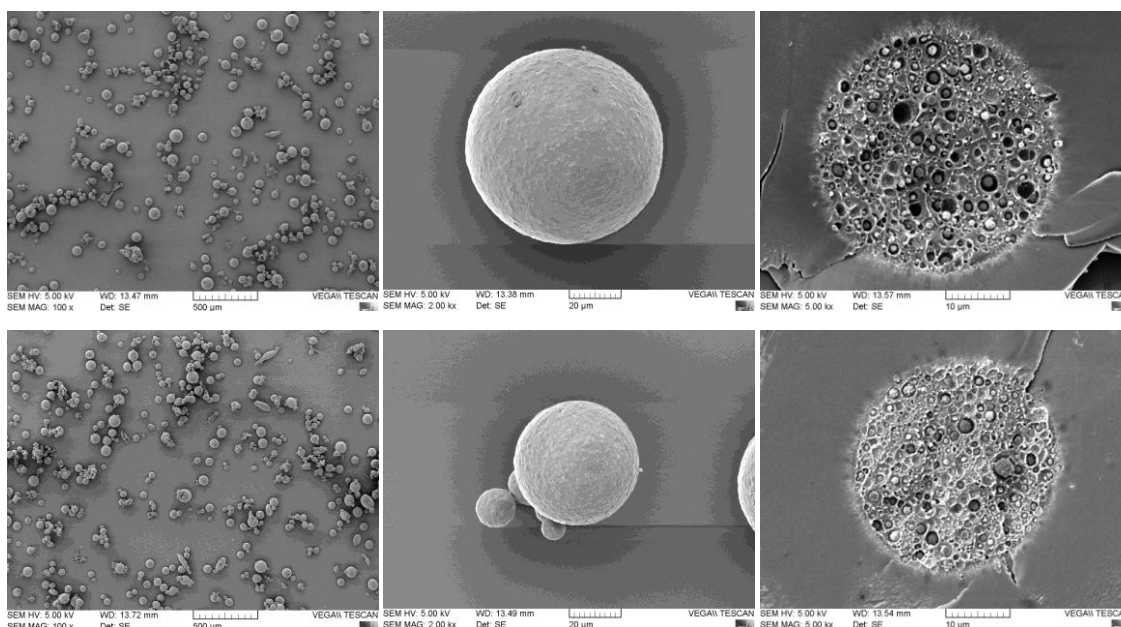


Abb. 6.9: REM-Aufnahmen von Formulierung L3 (nach 1 Monat gelagert bei 5 °C und 25 °C/60 % rF)



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Akers, M. J., Nail, S. L., and Saffell-Clemmer, W. Top ten hot topics in parenteral science and technology. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 61 [5], 337-361. 2007.
- Arica, B. and Lamprecht, A. In vitro evaluation of betamethasone-loaded nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 31 [1], 19-24. 2005.
- Arpagaus, C. and Schafroth, N. Spray Dried Biodegradable Polymers as target material for Controlled Drug Delivery. Best @Büchi. 2007. Switzerland.
- Arshady, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *Journal of Controlled Release* 17 [1], 1-21. 1991.
- Astellas. Fachinformation Eligard 22,5 mg Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung. 2011. Berlin, Rote Liste Service GmbH.
- Banga, A. K. Parenteral Controlled Delivery and Pharmacokinetics of Therapeutic Peptides and Proteins. *Therapeutic Peptides and Proteins*. [6], 177-213. 2006. CRC/Taylor & Francis.
- Basu, S. K., Govardhan, C. P., Jung, C. W., and Margolin, A. L. Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4 [3], 301-317. 2004.
- Bauer, K. H., Frömming, K.-H., and Führer, C. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. 8.Auflage. 2006. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Berkland, C., Kim, K., and Pack, D. W. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions. *Journal of Controlled Release* 73 [1], 59-74. 2001.
- Blanco, D. and Alonso, M. J. Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 [3], 285-294. 1998.
- Blasi, P., D'Souza, S. S., Selmin, F., and DeLuca, P. P. Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Controlled Release* 108 [1], 1-9. 2005.

- Bodmeier, R. and McGinity, J. W. Polylactic acid microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique I. Methods and morphology. *Journal of Microencapsulation* 4 [4], 279-288. 1987.
- Cavalier, M., Benoit, J. P., and Thies, C. The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly(( $\pm$ )-lactide) microspheres. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 38 [4], 249-253. 1986.
- Chang, R. K., Qu, W., Trivedi, N., and Johnson, J. Aliphatic polyesters. <http://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/> . 2011.
- Chen, X. Q., Yang, Y. Y., Wang, L., and Chung, T. S. Effects of inner water volume on the peculiar surface morphology of microspheres fabricated by double emulsion technique. *Journal of Microencapsulation* 18 [5], 637-649. 2001.
- Cohen, S., Alonso, M. J., and Langer, R. Novel approaches to controlled-release antigen delivery. *International Journal of Technology Assessment in Health Care* 10 [1], 121-130. 1994.
- Crotts, G. and Park, T. G. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *Journal of Controlled Release* 44 [2-3], 123-134. 1997.
- Crotts, G. and Park, T. G. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: Release kinetics and stability issues. *Journal of Microencapsulation* 15 [6], 699-713. 1998.
- Dunne, M., Corrigan, O. I., and Ramtoola, Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* 21 [16], 1659-1668. 2000.
- Elvassore, N., Bertuccio, A., and Caliceti, P. Production of Protein-Polymer Microcapsules by Supercritical Anti-Solvent Techniques. 5th International Symposium on Supercritical Techniques . 2000. Atlanta (USA).
- Essa, S., Rabanel, J. M., and Hildgen, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(d, l-lactide) (PLA) based nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75 [2], 96-106. 2010.
- Faisant, N., Akiki, J., Siepmann, F., Benoit, J. P., and Siepmann, J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory. *International Journal of Pharmaceutics* 314 [2], 189-197. 2006.
- Ferring Arzneimittel. Fachinformation Decapeptyl N 3,75 mg. 2010. Berlin, Rote Liste Service GmbH.

- Freytag, T., Dashevsky, A., Tillman, L., Hardee, G. E., and Bodmeier, R. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release* 69 [1], 197-207. 2000.
- HALL, C. E. and HALL, O. Polyvinyl alcohol: relationship of physicochemical properties to hypertension and other pathophysiologic sequelae. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 12, 721-736. 1963.
- Heinemann, A., Hildinger, M., and Bädeker, M. *Medizinische Biotechnologie in Deutschland* 2012. 2012.
- Hennink, W. E., van de Weert, M., and Jiskoot, W. Protein Instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles. *Pharmaceutical Research* 17 [10], 1159-1167. 2000. Springer Netherlands.
- Holzer, M. Antikörperbeladene PLGA-Nanopartikel als Trägersystem für eine verzögerte Wirkstofffreisetzung in der Tumorthherapie. 2010.
- Ibrahim, M. A., Ismail, A., Fetouh, M. I., and Göpferich, A. Stability of insulin during the erosion of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Journal of Controlled Release* 106 [3], 241-252. 2005.
- Izumikawa, S., Yoshioka, S., Aso, Y., and Takeda, Y. Preparation of poly (l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *Journal of Controlled Release* 15 [2], 133-140. 1991.
- Jeffery, H. and O'Hagan, D. T. The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics* 77, 169-175. 1991. Elsevier.
- Jiang, G., Thanoo, B. C., and DeLuca, P. Effect of osmotic pressure in the solvent extraction phase on BSA release profile from PLGA microspheres. *Pharmaceutical Development and Technology* 7 [4], 391-399. 2002.
- Jorgensen, L., Hostrup, S., Moeller, E. H., and Grohgan, H. Recent trends in stabilising peptides and proteins in pharmaceutical formulation - Considerations in the choice of excipients. *Expert opinion on drug delivery* 6 [11], 1219-1230. 2009.
- Jung, J. and Perrut, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *Journal of Supercritical Fluids* 20 [3], 179-219. 2001.

- Kim, H. K. and Park, T. G. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: Morphological effect on protein release. *Journal of Controlled Release* 98 [1], 115-125. 2004.
- Kissel, T., Li, Y., and Unger, F. ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 [1], 99-134. 2002.
- Klank, D. Partikelgrößen- und Partikelformanalyse durch Laserbeugung. *Partikelwelt* , 3-4. 2007.
- Lamprecht, A., Schäfer, U., and Lehr, C. M. Structural analysis of microparticles by confocal laser scanning microscopy. *AAPS PharmSciTech* 1 [3]. 2000a.
- Lamprecht, A., Ubrich, N., Hombreiro Pérez, M., Lehr, C.-M., Hoffman, M., and Maincent, P. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *International Journal of Pharmaceutics* 196 [2], 177-182. 2000b.
- Liu, Y. and Schwendeman, S. P. Mapping microclimate pH distribution inside protein-encapsulated PLGA microspheres using confocal laser scanning microscopy. *Molecular Pharmaceutics* 9 [5], 1342-1350. 2012.
- Lück, M., Pistel, K. F., Li, Y. X., Blunk, T., Müller, R. H., and Kissel, T. Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene). Influence of production method and polymer composition. *Journal of Controlled Release* 55 [2-3], 107-120. 1998.
- Lucke, A., Kiermaier, J., and Göpferich, A. Peptide acylation by poly( $\alpha$ -hydroxy esters). *Pharmaceutical Research* 19 [2], 175-181. 2002.
- Mäder, K., Bittner, B., Li, Y., Wohlauf, W., and Kissel, T. Monitoring microviscosity and microacidity of the albumin microenvironment inside degrading microparticles from poly(lactide-co- glycolide) (PLG) or ABA-triblock polymers containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethyleneoxide) B blocks. *Pharmaceutical Research* 15 [5], 787-793. 1998.
- Malzert-Fréon, A., Benoît, J. P., and Boury, F. Interactions between poly(ethylene glycol) and protein in dichloromethane/water emulsions: A study of interfacial properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 [3], 835-843. 2008.



- Miller, M. A., Engstrom, J. D., Ludher, B. S., and Johnston, K. P. Low viscosity highly concentrated injectable nonaqueous suspensions of lysozyme microparticles. *Langmuir* 26 [2], 1067-1074. 2010.
- Nair, L. S. and Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 32 [8-9], 762-798. 2007.
- O'Donnell, P. B. and McGinity, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28 [1], 25-42. 1997.
- Packhaeuser, C. B., Schnieders, J., Oster, C. G., and Kissel, T. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 [2], 445-455. 2004.
- Paillard-Giteau, A., Tran, V. T., Thomas, O., Garric, X., Coudane, J., Marchal, S., Chourpa, I., Benoît, J. P., Montero-Menei, C. N., and Venier-Julienne, M. C. Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75 [2], 128-136. 2010.
- Perugini, P., Genta, I., Pavanetto, F., Modena, T., Maculotti, K., and Conti, B. Evaluation of enzyme stability during preparation of polylactide-co-glycolide microspheres. *Journal of Microencapsulation* 19 [5], 591-602. 2002.
- Puthli, S. and Vavia, P. Formulation and performance characterization of radio-sterilized "Progestin-only" microparticles intended for contraception. *AAPS PharmSciTech* 10 [2], 443-452. 2009a.
- Puthli, S. and Vavia, P. R. Stability studies of microparticulate system with piroxicam as model drug. *AAPS PharmSciTech* 10 [3], 872-880. 2009b.
- Reiche, K. Correlation of Viscosity with Osmotic Second Virial Coefficient and Injectability of Protein Formulations. 2010.
- Rothen-Weinhold, A., Oudry, N., Schwach-Abdellaoui, K., Frutiger-Hughes, S., Hughes, G. J., Jeannerat, D., Burger, U., Besseghir, K., and Gurny, R. Formation of peptide impurities in polyester matrices during implant manufacturing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49 [3], 253-257. 2000.
- Rouse, J. J., Mohamed, F., and van der Walle, C. F. Physical ageing and thermal analysis of PLGA microspheres encapsulating protein or DNA. *International Journal of Pharmaceutics* 339, 112-120. 2007. Elsevier.
- Rungseevijitprapa, W. and Bodmeier, R. Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36 [4-5], 524-531. 2009.

- Rupp, U., Schoendorf-Holland, E., Eichbaum, M., Schuetz, F., Lauschner, I., Schmidt, P., Staab, A., Hanft, G., Huober, J., Sinn, H. P., Sohn, C., and Schneeweiss, A. Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: Final results of a phase I study. *Anti-Cancer Drugs* 18 [4], 477-485. 2007.
- Sauter, A., Kloft, C., Gronau, S., Bogeschdorfer, F., Erhardt, T., Golze, W., Schroen, C., Staab, A., Riechelmann, H., and Hoermann, K. Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *International Journal of Oncology* 30 [4], 927-935. 2007.
- Schaefer, M. J. and Singh, J. Effect of additives on stability of etoposide in PLGA microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27 [4], 345-350. 2001.
- Shugar, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 8 [C], 302-309. 1952.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., and Hermanson, G. T. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 [1], 76-85. 1985.
- Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H. P., and Gander, B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 [3], 357-376. 2005.
- The UniProt Consortium. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.*40 . 2012.
- Voigt, R. *Pharmazeutische Technologie*. Fahr, A. 10. Auflage. 2006. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
- Wagner, H., Vollmar, A., and Bechthold, A. *Pharmazeutische Biologie* 2. 7. Auflage. 2007. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Wang, J. and Schwendeman, S. P. Mechanisms of solvent evaporation encapsulation processes: Prediction of solvent evaporation rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88 [10], 1090-1099. 1999.
- Warne, N. W. Development of high concentration protein biopharmaceuticals: The use of platform approaches in formulation development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78 [2], 208-212. 2011.

- Whitaker, M. J., Hao, J., Davies, O. R., Serhatkulu, G., Stolnik-Trenkic, S., Howdle, S. M., and Shakesheff, K. M. The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying. *Journal of Controlled Release* 101 [1-3 SPEC. ISS.], 85-92. 2005.
- Wischke, C. and Borchert, H. H. Influence of the primary emulsification procedure on the characteristics of small protein-loaded PLGA microparticles for antigen delivery. *Journal of Microencapsulation* 23 [4], 435-448. 2005.
- Wu, X. S. Preparation, characterization and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Wise, D. L. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. 1, 1151-1200. 1995. New York, Marcel Dekker.
- Yang, Y. Y., Chung, T. S., and Ping Ng, N. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* 22 [3], 231-241. 2001.
- Youxin, L. and Kissel, T. Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic acid) or poly(L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks. *Journal of Controlled Release* 27 [3], 247-257. 1993.